

Série A, N° 2.968

N° d'ordre : 3.840

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Denise M. MEYER

1^{re} THÈSE :

ÉTUDE DE L'ACTION DES HYDRURES MÉTALLIQUES
DOUBLES SUR LES PEPTIDES ET LES PROTÉINES.

2^e THÈSE :

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 22 Janvier 1957 devant la Commission d'examen

MM. FROMAGEOT, Président

QUELET

LEDERER

} Examinateurs

PARIS

IMPRIMERIE R. FOULON

29, RUE DEPARCIEUX, 29

1957



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551528_0073

Série A, N° 2.968

N° d'ordre : 3.840

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Denise M. MEYER

1^{re} THÈSE :

ÉTUDE DE L'ACTION DES HYDRURES MÉTALLIQUES
DOUBLES SUR LES PEPTIDES ET LES PROTÉINES.

2^e THÈSE :

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 22 Janvier 1957 devant la Commission d'examen

MM. FROMAGEOT, Président

QUELET

LEDERER

} Examinateurs



PARIS

IMPRIMERIE R. FOULON

29, RUE DEPARCIEUX, 29

1957

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen J. PÉRÈS

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	LUCAS	T	Recherches physiques.
E. DARMOIS	T	Enseignement de Physique.	A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale.	ARNULF	T	Optique appliquée.
PAUTHENIER	T	Electrotechnique générale	M. MORAND	T	Physique.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.	SOLEILLET	T	Physique.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées	FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.	DANJON	T	Astronomie.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.	FROMAGEOT	T	Chimie biologique.
LAUGIER	T	Physiologie générale.	LAPORTE	T	Physique générale et Radioactivité.
M. CURIE	T	Physique (P.C.B.).	JANET	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
BARRABE	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.	PETIT	T	Biologie maritime.
G. DARMOIS	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique.
J. BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	GALLIEN	T	Embryologie.
PLANTEFOL	T	Botanique.	EICHHORN	T	Biologie végétale (P.C.B.).
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés.	DE CUGNAC	T	Biologie végétale (P.C.B.).
PRÉVOST	T	Chimie organique.	Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	THELLIER	T	Physique du Globe.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	L'HÉRITIER	T	Génétique.
WYART	T	Minéralogie.	GRIVET	T	Radioélectricité.
TESSIER	T	Zoologie.	PONCIN	T	Mécanique des fluides.
MANGENOT	T	Biologie végétale.	THIRY	T	Mécanique appliquée.
P. AUGER	T	Physique quantitative et Relativité.	DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres.
MONNIER	T	Physiologie des fonctions.	QUELET	T	Chimie organique.
PIVETEAU	T	Géologie.	CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).	CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
H. CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).	CUVILLIER	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
LAFFITTE	T	Chimie générale.	JUNG	T	Pétrographie.
FAVARD	T	Mécanique générale.	TRILLAT	T	Microscopie et Diffraction électronique.
COULOMB	T	Physique du Globe.	WIEMANN	T	Chimie organique structurale.
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (P.C.B.).	JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste.
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	VASSY		Physique de l'atmosphère.
P. DRACH	T	Zoologie.	DESTOUCHES		Théories physiques.
KASTLER	T	Physique.	M. PRIVOST	T	Géologie.
EPHRUSSI	T	Génétique.	AMIEL	T	Chimie (P.C.B.).
WURMSER	T	Biologie physico-chimique.	HOCART	T	Minéralogie.
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.).	J.-P. MATHIEU	T	Physique (P.C.B.).
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).	COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.).
			MAY	T	Biologie animale (P.C.B.).

CHOQUET	T	Calcul différentiel et intégral.	GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.).
FELDMANN		Biologie (P.C.B.).	PISOT	T	Calcul des probabilités.
GUINIER	T	Physique (P.C.B.).	E. ROCH		Géologie.
JOST	T	Biologie (P.C.B.).	SCHATZMANN ..		Astrophysique.
FORTET	T	Calcul des probabilités.	TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique.
SCHWARTZ	T	Méthode mathématique de la Physique.	ZAMANSKT	T	Mathématiques générales.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.	JOLIOT	T	Physique nucléaire et Radioactivité.
MALAVARD	T	Aviation.	LENNUIER		Physique (P.C.B.).
BRELOT	T	Calcul différentiel.	RIZET		Génétique.
NORMANT	T	Chimie (P.C.B.).	Mme TONNELAT ..		Théories physiques.
BÉNARD	T	Chimie (P.C.B.).	DIXMIER		Mathématiques (M.P.C.).
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).	SOUCHAY		Chimie (P.C.B.).
DUGUÉ	T	Statistiques mathématiques.	AIGRAIN		Physique (P.C.B.).
GÉLOSO		Chimie (S.P.C.N.).	BRUSSET		Chimie (P.C.B.).
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.	M. LÉVY		Physique théorique.
ULRICH	T	Physiologie végétale.	LENORMANT		Physiologie.
MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée.	Mme CHAIX		Chimie biologique.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.	Mme HUREL-PY ..		Biologie végétale (P.C.B.).
CHADEFAUD		Botanique.	PIAUX		Chimie (P.C.B.).
DESTRIAU	T	Physique (M.P.C.).	BRUN		Mécanique expérimentale des fluides.
Mlle LE BRETON ..		Physiologie générale.	LEDERER		Chimie biologique.
SALEM	T	Mathématiques générales.	Mme DUBREIL ..		Mathématiques.
LELONG	T	Mathématiques générales.	Mme LELONG ..		Mathématiques (E.N.S.).
DEVILLERS		Anatomie et Histologie comparées.	BELLAIR		Géologie (S.P.C.N.).
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.	COTTE	T	Physique (M.P.C.).
FRANÇON		Physique (M.P.C.).	J.-E. DUBOIS ..		Chimie (M.P.C.).
GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	LAMOTTE		Zoologie.
			LE ROLLAND ...		Mécanique des fluides.
			MICHEL		Chimie (P.C.B.).

Secrétaire général C. MONIER

INTRODUCTION

Depuis longtemps, on s'est attaqué au vaste problème posé par la structure des protéines. Mais c'est seulement récemment que le côté chimique de ce problème, en particulier l'ordre d'enchaînement des acides aminés dans les molécules, a pu recevoir un début de réalisation.

L'établissement de la structure chimique d'une protéine requiert la connaissance des séquences des acides aminés dans la chaîne peptidique ainsi que la détermination du nombre de chaînes peptidiques composant la molécule. La séquence des acides aminés peut être déterminée soit par scissions, obtenues généralement par hydrolyse de la chaîne peptidique, suivies de l'étude des différents fragments obtenus ; soit encore par dégradation systématique à partir d'une extrémité. La connaissance du nombre de chaînes peptidiques dans une molécule protéique implique en tout premier lieu la détermination quantitative de ses acides aminés N-terminaux et C-terminaux. Il est clair que pour des raisons analytiques, la caractérisation qualitative de ces acides aminés terminaux a son importance comme point de départ pour la détermination ultérieure de l'ordre d'enchaînement des acides aminés. Elle est également importante pour l'étude des propriétés biologiques : les travaux de OLCOTT et FRAENKEL-CONRAT [1] d'une part et ceux de PORTER [2] d'autre part, ont été parmi les premiers à montrer qu'il existe une relation entre la structure et l'activité d'une protéine.

Actuellement, on détermine les groupements N-terminaux d'un peptide ou d'une protéine par la méthode de SANGER [3] ou par celle d'EDMAN [4]. De même, une dégradation systématique à partir de l'extrémité aminée suivant la technique d'EDMAN [4] modifiée récemment par FRAENKEL-CONRAT [5, 6] et par FOX et coll. [7, 8, 9] permet de connaître les premiers enchaînements relatifs à ces extrémités. Mais l'on peut dire qu'il n'existe pas de méthode parfaitement satisfaisante pour l'identification des résidus C-terminaux des peptides et protéines. Ce problème nous a paru intéressant à explorer, aussi exposons-nous ici une méthode pour l'identification des radicaux car-

boxyliques libres dans les peptides et les protéines : la réduction de ces groupes en alcools primaires nous a paru particulièrement intéressante à expérimenter. Nous nous sommes basés sur les travaux de NYSTROM et BROWN [10, 11, 12] qui ont utilisé l'hydrure double de lithium et d'aluminium (LiAlH_4) pour réduire certains acides organiques en leurs alcools correspondants, et nous avons étendu ce mode de réduction aux peptides et aux protéines.

L'exposé de notre travail comporte quatre parties :

- 1° L'historique des divers travaux concernant l'identification des résidus C-terminaux des peptides et protéines, au moyen de méthodes différentes de la nôtre.
 - 2° La méthode de réduction et les diverses techniques que nous avons utilisées.
 - 3° L'application de cette méthode aux peptides.
 - 4° L'application de cette méthode aux protéines.
-

PREMIERE PARTIE

HISTORIQUE DES AUTRES METHODES

Une revue des méthodes d'identification des acides C-terminaux dans les peptides et les protéines a été publiée en 1945 par Fox [13] ; depuis, PÉNASSE [14] puis JUTISZ [15] en ont complété l'analyse. Parmi toutes ces méthodes, il faut distinguer principalement les méthodes enzymatiques et chimiques qui, toutes deux, ont donné lieu à des résultats intéressants dans le domaine des peptides et protéines.

I. — METHODES ENZYMATIQUES

La carboxypeptidase, enzyme protéolytique capable de libérer l'acide aminé C-terminal d'une chaîne peptidique, a été utilisée par différents auteurs ; mais son emploi n'est pas sans présenter diverses difficultés.

SMITH [16], en 1951, a publié une revue des conditions requises pour l'emploi de la carboxypeptidase : 1° l'acide aminé C-terminal doit avoir son carboxyle libre ; 2° dans le cas d'un dipeptide, le groupe aminé libre doit être bloqué ; dans le cas général, l'éloignement du — NH₂ initial influe sur la vitesse de la réaction ; 3° seuls les résidus des acides aminés naturels de la série L sont hydrolysés ; 4° enfin la vitesse de réaction dépend également de la nature du résidu C-terminal.

La carboxypeptidase a été utilisée pour la première fois dans le domaine des peptides par WALDSCHMIDT-LEITZ et GAUSS [17] et dans celui des protéines par LENS [18] qui caractérisa ainsi l'alanine comme l'un des résidus C-terminaux de l'insuline. Depuis, toute une série de travaux en ont montré les applications ainsi que les difficultés que l'on peut rencontrer :

En effet, il y a des cas où les résultats obtenus peuvent être interprétés d'une façon erronée. STEINBERG, par exemple [19, 20], trouva initialement que l'ovalbumine était attaquée par la carboxypeptidase ; mais, par la suite, il attribua ce phénomène à une impureté protéolytique présente dans l'enzyme et, avec un produit pur, ne trouva plus de groupement C-terminal. DAVIE et NEURATH [21] supposent que certaines protéines peuvent résister à l'action de la carboxypeptidase pour des raisons stériques dues à une configuration particulière de la molécule protéique (cas de la DFP-trypsine). Enfin, dans le cas de l'hormone de croissance, LI et coll. [22] ont trouvé au moyen de la carboxypeptidase deux radicaux de phénylalanine ; le doute subsiste alors, quant à l'origine de ces radicaux ; ils peuvent provenir soit d'une même chaîne par dégradations successives d'un enchaînement Phe-Phe, soit de deux chaînes différentes.

D'après DESNUELLE [23] différents cas sont à envisager lorsque l'on fait agir la carboxypeptidase sur un peptide ou une protéine : 1° la carboxypeptidase peut ne couper aucun acide aminé, même si le peptide possède un radical C-terminal ; 2° le premier et le deuxième acide aminé peuvent être libérés presque simultanément ; 3° enfin dans le cas de protéines comportant plusieurs chaînes peptidiques, le deuxième acide aminé de la première chaîne peut être libéré avant le premier acide aminé des autres chaînes. Quoi qu'il en soit, depuis que l'on sait préparer de la carboxypeptidase pure, débarrassée des autres enzymes et surtout de la trypsine [24], cet enzyme est devenu un outil précieux entre les mains des chercheurs travaillant sur la structure chimique des protéines ; et c'est actuellement la seule méthode vraiment valable. Il n'en demeure pas moins qu'il existe des cas où il est pratiquement impossible d'interpréter les résultats obtenus et où l'on doit faire appel à une autre méthode pour confirmer ou infirmer le résultat obtenu : l'intérêt de cette vérification au moyen d'une méthode chimique est en effet apparu à différents chercheurs.

II. — METHODES CHIMIQUES

Trois catégories de méthodes ont été proposées.

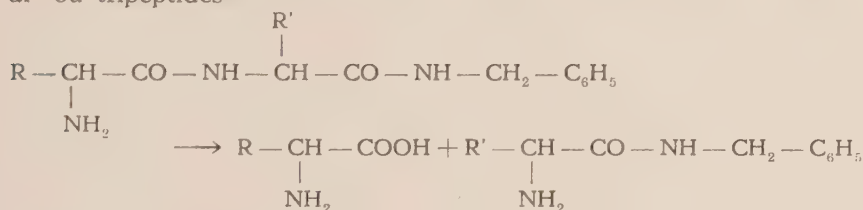
1. CONDENSATION DU CARBOXYLE AVEC UN REACTIF SPECIFIQUE

Les possibilités de condenser le carboxyle libre de l'acide aminé terminal avec un réactif spécifique, donnant une liaison stable à l'hydrolyse, sont limitées à cause de la faible réactivité de ce groupe.

On peut citer néanmoins :

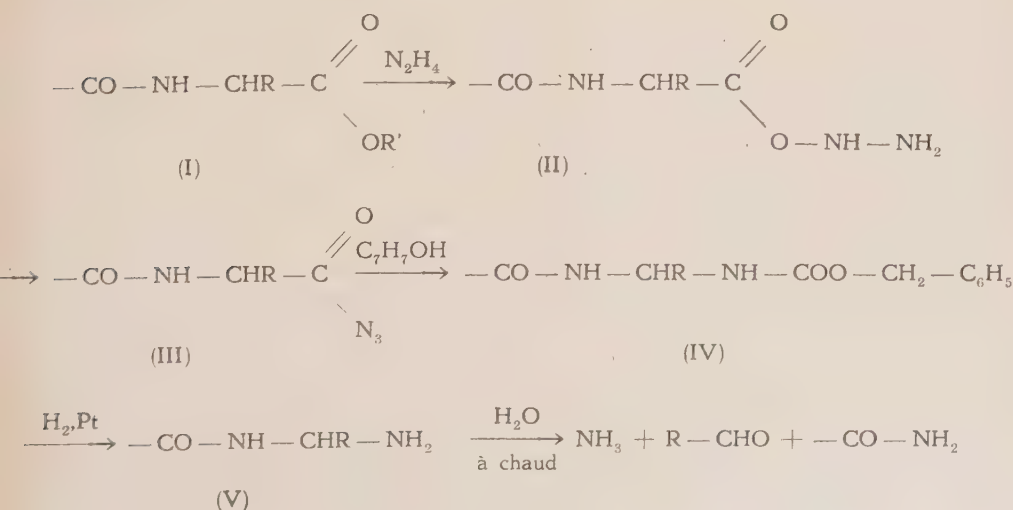
a) MÉTHODE A LA BENZYLAMINE DE ABDERHALDEN ET BROCKMANN [25] :

On chauffe le peptide estérifié dans de la benzylamine. Cette dernière se fixe sur les radicaux carboxyliques et, par hydrolyse acide, on obtient en particulier un acide aminé amino-benzylé correspondant à l'acide aminé C-terminal du peptide initial. Cette méthode, qui nécessite une grande quantité de produit, n'est applicable qu'à des di- ou tripeptides



b) MÉTHODE DE BERGMAN-ZERVAS [26] :

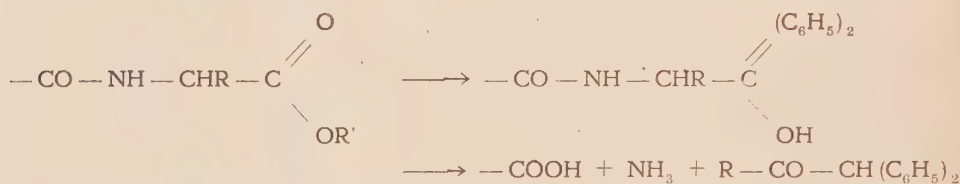
Le N-acyl peptide estérifié (I) est transformé en hydrazide (II) puis en azide (III) et finalement en benzyluréthane (IV) par traitement à chaud dans l'alcool benzylique. Par hydrogénation de ce dernier produit, on obtient un aminoaldéhyde (V) qui, à chaud, se scinde en ammoniac, aldéhyde et un peptide amidé plus court d'un acide aminé.



Cette méthode a uniquement été appliquée à un tétrapeptide : l'acide benzoylglycylalanylleucylglutamique. En effet elle est fort complexe et son rendement ne dépasse pas 10 %.

c) MÉTHODE DE BETTZICHE [27] :

Elle est basée sur l'utilisation du réactif de GRIGNARD : bromure de phényle (ou benzyle) magnésium, que l'on fait agir sur un peptide estérifié. Le produit de condensation diphénylé ainsi obtenu est hydrolysé ; finalement, on obtient une diphénylcétone caractérisant l'acide aminé C-terminal.



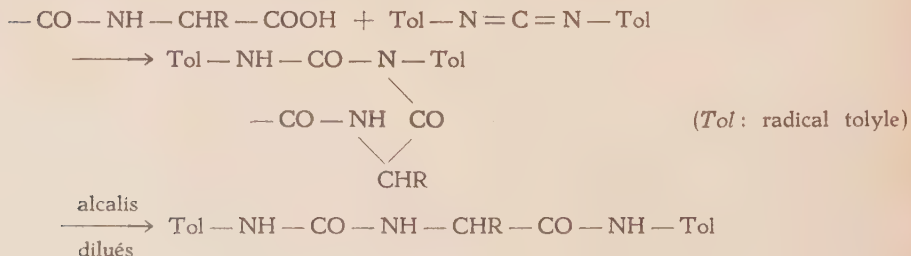
Cette méthode a été appliquée par KENDALL et coll. [28] au glutathion.

d) MÉTHODE AU β -NAPHTOL SELON LICHTENSTEIN ET COLL. [29] :

Cette méthode ne peut pas servir dans le cas de di- ou tétra-peptides et est seulement valable dans le cas des tripeptides. En chauffant un tripeptide en présence de β -naphтол, les deux premiers acides aminés se cyclisent alors que le dernier est libéré. Encore faut-il tenir compte du fait que cette réaction nécessite un chauffage brutal, d'où destruction de certains acides aminés libérés.

e) FORMATION D'ACYLURÉE :

Utilisant une réaction due à ZETZSCHE et coll. [30], KHORANA [31] traite le N-acylpeptide, à température ordinaire, par la di-4-tolylcarbodi-imide.

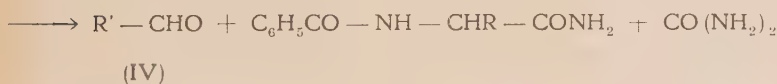
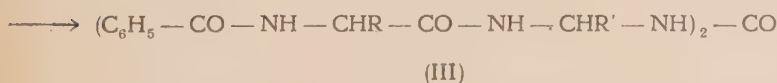
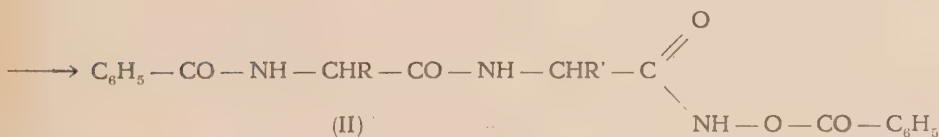
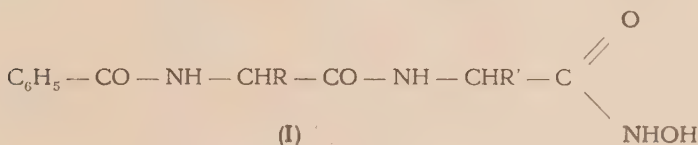


L'acylurée ainsi formée est scindée à froid par les alcalis dilués et l'acide aminé C-terminal est alors régénéré par hydrolyse alcaline.

Dans cette méthode, appliquée seulement aux peptides simples, il y a des risques de contamination du peptide dégradé par le peptide initial; l'auteur lui-même signale cet inconvénient.

f) RÉACTION DE LOSSEN :

Cette réaction est utilisée par WIELAND et FRITZ [32] : le N-benzoylpeptide est transformé en son acide hydroxamique (I) puis en dérivé O-benzoyl de cet acide (II). Ce dérivé donne à froid et en milieu faiblement alcalin un uréide symétrique (III) ; ce dernier, après une courte ébullition dans l'acide chlorhydrique N/10, est scindé en aldéhyde correspondant à l'acide aminé C-terminal, urée et amide du N-acylpeptide (ou acide aminé) résiduel. L'aldéhyde ainsi obtenu (IV) est identifié par chromatographie sur papier à l'état d'hydrazone.

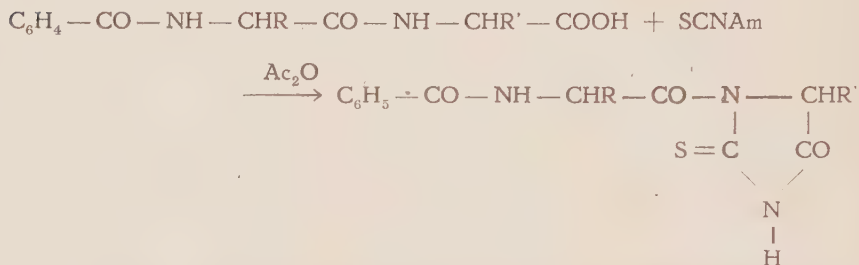


Cette méthode a été appliquée à la glycylleucine et à la glycylo-leucylalanine. Les auteurs éprouvent quelques difficultés dans le cas du tripeptide.

g) FORMATION DE LA THIOHYDANTOINE :

Cette méthode repose sur les réactions déjà proposées en 1926 par SCHLACK et KUMPF [33] : le N-benzoylpeptide est chauffé en

présence d'anhydride acétique et de thiocyanate d'ammonium ; il y a alors formation de la thiohydantoïne de l'acide aminé C-terminal. Après hydrolyse alcaline, on peut isoler par cristallisation cette thiohydantoïne.



Il est indispensable de benzoyler le radical aminé afin d'éviter qu'il ne réagisse avec le thiocyanate.

Cette méthode donne généralement un grand nombre de produits secondaires mal définis ; aussi elle ne peut s'appliquer qu'aux peptides simples. NICOLET [34] l'utilisa pour déterminer la structure du glutathion.

Plusieurs modifications de cette méthode ont été proposées ces dernières années par différents chercheurs.

— TIBBS [35] a repris cette méthode en la complétant : la thiohydantoïne, une fois isolée, est hydrolysée et l'acide aminé libéré est identifié par chromatographie sur papier. Mais, même ainsi modifiée, cette méthode n'est applicable qu'à des peptides.

— WALEY et WATSON [36] ont proposé une méthode analogue, mais faisant intervenir des conditions plus douces. Ils ont appliqué leur technique à l'insuline, identifiant ainsi qualitativement l'alanine C-terminale de cette protéine.

— BAPTIST et BULL [37] ont également apporté quelques modifications à cette dernière méthode, mais ne l'ont appliquée qu'à des acylpeptides. Ils constatent que leur méthode ne convient pas dans le cas de lysine ou arginine C-terminales.

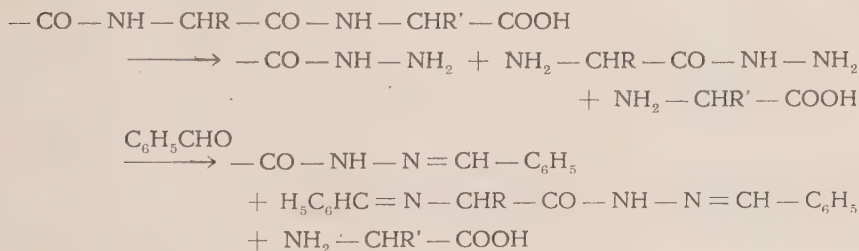
— TURNER et SCHMERZLER [38], travaillant dans des conditions analogues à celles de WALEY et WATSON, ont appliqué cette méthode à divers peptides et protéines ; ils constatent qu'elle ne s'applique pas dans le cas d'acides aspartique ou glutamique, sérine et proline C-terminaux. En outre, ils trouvent, dans le cas de l'ovalbumine, un résidu C-terminal d'alanine qui, étant donné les résultats dus à STEINBERG [19, 20], ne peut provenir que de l'ovalbumine partiellement hydrolysée lors du traitement à chaud dans l'acide acétique.

— KENNER, KHORANA et STEDMAN [39] pour éviter ce risque d'hydrolyse, remplacent le thiocyanate d'ammonium par le diphénylphosphoroisothiocyanatidate qui réagit à température ordinaire avec les N-acylpeptides pour donner les thiohydantoïnes correspondantes. Mais jusqu'à présent ils n'ont appliqué leur technique qu'à quelques peptides simples.

— Enfin, tout récemment, Fox [40] a repris cette étude en utilisant la méthode d'identification par essais microbiologiques, déjà employée par lui pour déterminer les groupements N-terminaux [7, 8, 9]. Il l'a appliquée à des dipeptides et des tripeptides, ainsi qu'au lysozyme.

2. SCISSION SPECIFIQUE DU GROUPE C—TERMINAL NON TRANSFORME

AKABORI et ses collaborateurs [41] traitent les peptides ou les protéines par l'hydrazine anhydre. D'après ces auteurs, l'hydrazine scinde l'acide aminé C-terminal sans le modifier alors que si elle attaque d'autres liaisons peptidiques les aminoacides résultants sont transformés en hydrazides. Après traitement par le benzaldéhyde, ces derniers précipitent sous forme insoluble et le ou les acides C-terminaux non transformés restent en solution et sont identifiés par chromatographie sur papier.



Ces auteurs ont appliqué cette méthode au glutathion, à la tyrocidine et aux insulines de différentes provenances.

— OHNO [42, 43, 44] a appliqué cette technique au lysozyme, en la modifiant légèrement : après « hydrazinolyse », il sépare les produits formés au moyen de leurs dérivés dinitrophénylés (DNP), et identifie alors le DNP-aminoacide correspondant à l'aminoacide C-terminal.

— LOCKER [45], à son tour, travaillant dans des conditions analogues à celles de AKABORI et coll. [41], a appliqué cette méthode à la myosine, à la tropomyosine et à l'actine.

— Enfin, tout récemment, NIU et FRAENKEL-CONRAT [46] ont repris cette étude en combinant les techniques de AKABORI et coll. et de OHNO. Ils ont appliqué cette méthode à différents peptides et protéines, étudiant en détail ses diverses possibilités.

3. METHODE UTILISANT L'OXYDATION DU CARBOXYLE

BOISSONNAS [47] a décrit une méthode mettant en jeu l'oxydation anodique du peptide dont le NH_2 libre a été bloqué au préalable par un radical carbobenzoxy ou dinitrophényle ; le produit oxydé est ensuite hydrolysé. La chromatographie sur papier des produits d'hydrolyse montre la disparition de l'acide aminé C-terminal oxydé, cette disparition ne pouvant être observée que si ce type d'acide aminé n'existe qu'à un seul exemplaire dans la molécule.

Après une hydrolyse partielle, on peut répéter l'opération et caractériser l'acide aminé suivant, la même réserve étant évidemment toujours justifiée.

Pour conclure, il faut noter qu'aucune de ces méthodes chimiques n'a pu donner entière satisfaction. Si nombre d'entre elles sont applicables sans trop de difficultés aux peptides, il n'en est plus de même lorsque l'on s'adresse aux molécules protéiques : seules les méthodes à la thiohydantoïne et à l'hydrazine ont donné lieu à des résultats intéressants dans ce domaine ; néanmoins, les difficultés que l'on rencontre varient selon les cas, et bien souvent, il est à craindre que le réactif lui-même ne soit trop brutal pour pouvoir laisser intacte une structure aussi aisément altérable que celle d'une protéine.

DEUXIEME PARTIE

METHODE DE REDUCTION ET TECHNIQUES UTILISEES

Le principe de notre méthode d'identification des résidus C-terminaux des peptides et protéines est le suivant :

- 1° Réduction des groupes —COOH libres d'un peptide ou d'une protéine, en groupes alcools primaires correspondants.
- 2° Hydrolyse du produit réduit.
- 3° Séparation des aminoalcools formés. Leur identification et leur détermination quantitative.

Nous allons décrire ici successivement les techniques utilisées à ces différents stades.

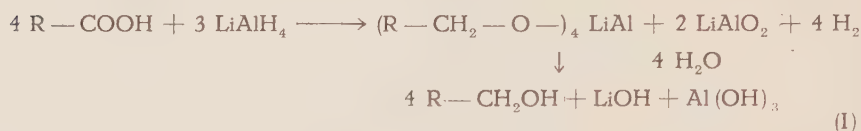
I. — REDUCTION

Pour la réduction, nous avons fait appel aux hydrures métalliques doubles : l'hydrure double de lithium et d'aluminium (LiAlH_4) et celui de lithium et de bore (LiBH_4) qui, tous deux, nous ont été fournis par le commerce.

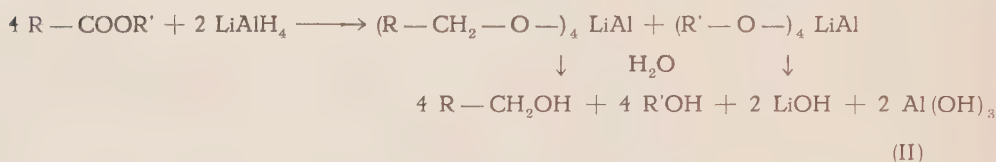
L'emploi de ces hydrures doubles en chimie est dû à SCHLESINGER et coll. [48] ainsi qu'à BROWN et coll. [10, 11, 12]. Divers auteurs [49, 50] ont formulé des théories sur leur mode d'action ; aucune de ces théories ne donne pleine satisfaction. Quoi qu'il en soit, les radicaux les plus réductibles sont ceux qui possèdent un caractère électronégatif, ce qui tend à prouver que la réaction a un caractère polaire.

Des revues sur l'utilisation de ces hydrures en chimie organique ont été publiées par SOLMS [51] et par BROWN [52]. Parmi les fonctions les plus réductibles, on note les radicaux carboxyliques et leurs

esters. La réduction, au moyen de LiAlH_4 , d'un groupement carboxylique libre en alcool correspondant, se fait suivant les réactions :



Dans le cas d'un carboxyle estérifié, ces réactions deviennent :



Nous voyons qu'il y a formation d'alcoolates métalliques qui sont ensuite décomposés par l'eau en alcools et hydroxydes métalliques. L'emploi de LiBH_4 conduit aux mêmes alcools finaux mais, dans ce cas, les produits intermédiaires sont beaucoup plus complexes.

PRINCIPE DE LA METHODE

Lorsque nous nous trouvons en présence d'une ou plusieurs chaînes peptidiques il faut considérer :

- 1° L'action de l'hydrure double sur les groupements carboxyliques libres terminaux des différentes chaînes.
- 2° L'action de cet hydrure sur les groupements carboxyliques libres appartenant aux acides aminés dicarboxyliques placés à l'intérieur des chaînes peptidiques.
- 3° La réduction des groupes disulfure S-S.
- 4° Enfin, des réductions « parasites » éventuelles de la liaison peptidique, réactions secondaires que nous étudierons en détail lors de la réduction des peptides.

Si nous ne tenons pas compte des deux derniers cas, les différentes possibilités de réduction sont résumées dans le *tableau I*.

En examinant le *tableau I*, nous voyons que les aminoalcools basiques formés en A, B et C correspondent respectivement à un acide aminé neutre, dicarboxylique ou basique C-terminal de la chaîne peptidique.

Quant aux aminoalcools formés en D et E, ils sont obtenus à partir des acides aspartique ou glutamique situés dans l'enchaînement

Tableau I

PRODUITS POUVANT SE FORMER LORS DE LA RÉDUCTION D'UNE CHAÎNE PEPTIDIQUE

Résidus d'acides aminés ayant un groupe carboxylique libre Produits de réduction Aminoalcools correspondants libérés après hydrolyse		
A	$\begin{array}{c} \text{— CO — HN — CH — COOH} \\ \\ \text{R} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{— CO — HN — CH — CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{R} \end{array}$
B	$\begin{array}{c} \text{— CO — HN — CH — COOH} \\ \\ (\text{CH}_2)_n \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{— CO — HN — CH — CH}_2\text{OH} \\ \\ (\text{CH}_2)_n \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$
C	$\begin{array}{c} \text{— CO — HN — CH — COOH} \\ \\ \text{R — NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{— CO — HN — CH — CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{R — NH}_2 \end{array}$
D	$\begin{array}{c} \text{— CO — HN — CH — COHN —} \\ \\ (\text{CH}_2)_n \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{— CO — HN — CH — COHN —} \\ \\ (\text{CH}_2)_n \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$
E	$\begin{array}{c} \text{— CO — HN — CH — COOH} \\ \\ (\text{CH}_2)_n \\ \\ \text{COHN —} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{— CO — HN — CH — CH}_2\text{OH} \\ \\ (\text{CH}_2)_n \\ \\ \text{COHN —} \end{array}$

peptidique et possédant encore un groupe carboxylique libre ; deux isomères sont en effet possibles dans chaque cas, chacun étant caractéristique de la liaison à laquelle participe l'acide aminé dicarboxylique dans le peptide. Ces aminoalcools neutres constituent, à eux seuls, un problème différent de celui qui nous préoccupe, et ils ont fait l'objet d'une étude spéciale de la part de JOLLÈS et FROMAGEOT [53, 54, 55].

TECHNIQUE DE LA REDUCTION

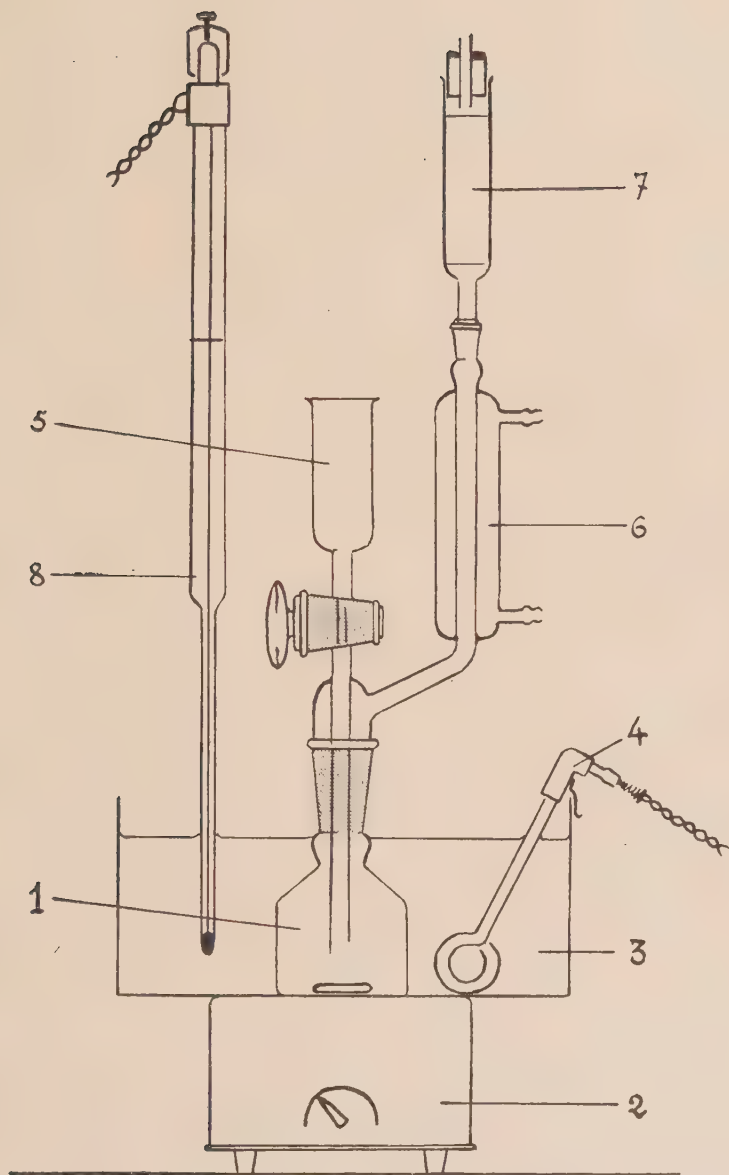
L'hydrure double de lithium et d'aluminium est une poudre blanche facilement décomposable par l'oxygène et par l'eau, cette dernière réaction étant des plus violentes ; quant à son emploi, il doit se faire en milieu anhydre et à l'abri de l'air. Lorsque l'on utilise l'hydrure double de lithium et de bore, les procédés de réduction sont les mêmes que pour l'hydrure de lithium et d'aluminium, mais il n'est plus indispensable de travailler en milieu anhydre ; cependant LiBH_4 solide, qui est également une poudre blanche, doit être traité à l'abri de l'air humide.

Nous avons opéré dans une « boîte sèche », enceinte cylindrique hermétique en métal où l'on réalise et entretient soigneusement une atmosphère d'azote sec et parfaitement débarrassée d'oxygène. La partie supérieure est formée d'une glace transparente épaisse adaptée à la boîte par un joint de caoutchouc ; elle permet d'en voir l'intérieur. On manipule le contenu de la boîte au moyen de gants de caoutchouc fixés à deux orifices circulaires sur les parois. Enfin, un système d'écluse à double portes, entre lesquelles on peut faire le vide et envoyer de l'azote sec, permet l'entrée et la sortie de divers objets sans altérer l'atmosphère entretenue dans l'appareil.

Dans la boîte sèche, l'hydrure est broyé très finement au mortier et on prélève la quantité nécessaire qui est introduite dans le ballon à réaction. La réduction elle-même est effectuée dans l'appareil représenté par la *figure 1* ; elle a lieu à l'abri de l'air, sous atmosphère d'azote, et dans le solvant approprié.

SOLVANTS UTILISES

Les hydrures métalliques doubles ne sont solubles que dans quelques solvants anhydres dépourvus de caractère hydrophile et n'ayant aucun hydrogène mobile. Les solvants les plus fréquemment utilisés sont : soit l'éther éthylique, employé en particulier lors de la synthèse



(Ech. 1/3)

FIGURE 1: Boîte sèche

1 : Ballon à fond plat pour la réduction ; 2 : Agitateur magnétique ; 3 : Bain d'eau ; 4 : Résistance chauffante ; 5 : Entonnoir à robinet servant à l'arrivée d'azote sec sans oxygène, ainsi qu'à l'introduction des solutions ; 6 : Réfrigérant à reflux ; 7 : Tube desséchant à SO_4Ca anhydre ; 8 : Thermostat.

(L'appareil, en verre Pyrex, est muni de rodages normalisés. Les différents supports n'ont pas été représentés sur la figure.)

des aminoalcools ; soit le tétrahydrofurane (THF), la N-méthylmorpholine ou la N-éthylmorpholine, qui sont des solvants de choix. Tous ces solvants ont été préalablement purifiés et séchés : ils sont conservés sur sodium.

ACTIVITE DU PRODUIT

Nous avons dosé l'activité du réducteur utilisé par une méthode gazométrique simplifiée consistant à mesurer dans une burette à gaz le volume d'hydrogène dégagé par action d'acide sulfurique environ normal, soit sur un poids d'hydrure finement broyé, soit sur une partie aliquote de la solution d'hydrure préparée en vue de la réduction.

On sait en effet que :



d'où si A mg d'hydrure dégagent V cm³ de gaz, la teneur en pour cent d'hydrure double est égale à :

$$\text{T \%} = \frac{41,5 \times V_0}{A}$$

avec :

$$V_0 \text{ cm}^3 = \frac{V}{1 + \alpha t} \cdot \frac{p - F}{p_0}$$

p₀ : 760 mm

p : p. atm

t : température

F : pression de la vapeur d'eau

α : 1/273

II. — HYDROLYSE

L'hydrolyse du produit réduit ne nécessite aucune technique spéciale : elle est faite au moyen d'acide chlorhydrique 6 N aussi pur que possible, pendant 24 heures, en tube scellé à l'étuve à 110°, ou à reflux.

III. — AMINOALCOOLS

Notre étude étant basée sur la formation des aminoalcools au sein de la molécule peptidique ou protéique, il nous a fallu avoir à notre disposition en guise de témoins tous les aminoalcools corres-

pondants aux acides aminés naturels. Nous examinerons successivement ici la préparation, l'isolement, la caractérisation et le dosage de ces aminoalcools.

1. PREPARATION

Sauf la colamine, aminoalcool correspondant au glycolle, qui nous a été fournie par le commerce, nous avons synthétisé presque tous les aminoalcools basiques par réduction des esters méthyliques ou éthyliques des acides aminés correspondants, au moyen de l'hydrure double de lithium et d'aluminium dans l'éther anhydre : 1° alaninol, sérinol, leucinol, prolinol, phénylalaninol, tyrosinol, aspartidiol et glutamidiol ont été synthétisés selon la technique de KARRER, PORTMANN et SUTER [56] ; par un procédé semblable, thréoninol, valinol, lysinol et isoleucinol ont été obtenus pour la première fois [14, 57] ; 2° histidinol et tryptophanol ont été synthétisés selon les méthodes spéciales décrites par KARRER, SUTER et WASER [58], et KARRER et PORTMANN [59] ; 3° l'argininol a été synthétisé par RHEIN et JUTISZ [60] ; dans ce dernier cas il est nécessaire de protéger le groupe guanidyle par benzylation avant d'effectuer l'estérification et la réduction ; après réduction, l' aminoalcool est libéré par hydrolyse.

Quant aux aminoalcools neutres provenant de la réduction de l'un des deux groupes carboxyliques libres des acides aspartique ou glutamique situés dans l'enchaînement peptidique, ils ont été synthétisés par JOLLÈS et FROMAGEOT [53, 54]. Toutefois ils n'interviennent aucunement dans les diverses méthodes d'isolement que nous avons mises au point successivement, nos techniques ne concernant que les aminoalcools basiques.

2. DEMINERALISATION

Deux procédés ont été utilisés :

- a) Electrolyse dans l'appareil à cathode de mercure mobile [61]. Avant de procéder à l'isolement des aminoalcools sur colonne de silice, on peut ainsi débarrasser l'hydrolysate du produit réduit, des sels minéraux qu'il contient.
- b) Passage sur Permutite 50 [62], résine polystyrène-sulfoné. Des colonnes de Permutite 50, forme H^+ , sont utilisées dans le cas des benzoyl-acides aminés ou dipeptides réduits, pour déminéraliser le produit brut de la réduction. Après hydrolyse, nous avons pu identifier les aminoalcools formés, directement par chromatographie sur papier, l'isolement de ces produits n'étant pas nécessaire vu le petit nombre de corps en présence.

3. ISOLEMENT

Une fois le peptide ou la protéine réduits, on libère par hydrolyse les aminoalcools formés. Le problème qui s'est alors posé à nous a été celui de l'isolement de ces aminoalcools ; divers procédés ont été successivement utilisés, dans le cas des aminoalcools basiques.

a) EXTRACTION A L'ÉTHER EN MILIEU ALCALIN :

L'hydrolysate acide est concentré sous vide plusieurs fois, en alternant avec des additions d'eau distillée ; finalement on l'amène à l'état sirupeux. On alcalinise par quelques gouttes de soude concentrée, le liquide étant maintenu froid, et absorbe le tout aussi complètement que possible par une quantité convenable de Hyflo-supercel (purifié par lavage à l'eau et à l'éther, puis séché à 110°). La masse obtenue est extraite par l'éther au Soxhlet pendant 30 heures : seuls les aminoalcools basiques formés au cours de la réduction passent dans l'éther, les sels alcalins des aminoacides et des aminoalcools neutres formés n'étant pas solubles dans l'éther. L'identification est alors effectuée par chromatographie sur papier. Cette méthode utilisée par nous lors de la réduction de l'insuline [57] est loin d'être quantitative, aussi l'avons-nous abandonnée.

b) EMPLOI DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR SILICE :

Un meilleur moyen de séparer les aminoalcools basiques consiste à utiliser la chromatographie sur silice [63]. Nous avons observé que le caractère basique prononcé de ces substances leur permet d'être absorbées sur silice en même temps que les aminoacides basiques.

L'hydrolysate du produit réduit est tout d'abord débarrassé de ses sels minéraux (LiCl) dans l'appareil à déminéralisation par électrolyse [61]. La solution déminéralisée est chromatographiée sur une colonne de silice ; par lavage avec de l'eau, on élimine tous les composés non basiques, puis les aminoalcools formés et les bases hexoniques sont élués avec de l'acide chlorhydrique 0.1 N. L'identification s'effectue ensuite par chromatographie sur papier. Cette méthode a été utilisée par PÉNASSE et coll. [64] dans le cas de l'ovomucoïde.

c) FORMATION DES DÉRIVÉS 2,4-DINITROPHÉNYLÉS (DNP) [65] :

Le principe de cette technique est le suivant. L'hydrolysate total de peptide ou protéine réduit est traité par le fluoro-2,4-dinitrobenzène (FDNB) [3]. On obtient un mélange des dérivés 2,4-dinitrophénylés (DNP) des aminoacides et des aminoalcools. Par extraction à l'éther en milieu alcalin, les DNP des aminoalcools basiques passent

en solution dans l'éther, alors que les DNP des aminoacides ou aminoalcools neutres, ayant un groupement carboxylique salifiable, restent solubles dans le milieu alcalin. Cet extrait éthéré est ensuite utilisé pour l'identification des aminoalcools.

Cette nouvelle technique, basée sur la formation des DNP-aminoalcools, a rendu nécessaire la synthèse de ces nouveaux dérivés ; celle-ci a été réalisée par Jurisz et coll. [65]. D'autres auteurs ont également signalé que c'est là la méthode la plus commode de dosage des aminoalcools [66, 67, 68, 69].

Mode opératoire :

A une prise de 1 ml renfermant les aminoacides et aminoalcools en quantité correspondant à 2,5 mg de protéine réduite, on ajoute 1 ml d'acétone, 45 mg de bicarbonate de sodium, et 1 ml d'une solution de FDNB à 2 % dans l'acétone. On agite pendant 2 heures à température ordinaire. En fin de réaction, l'excès de FDNB est détruit en ajoutant 50 mg d'alanine et en continuant l'agitation pendant 2 heures. L'acétone est évaporée sous vide sans chauffer, on dilue la solution à 10-15 ml par de l'eau et vérifie le pH qui doit toujours être alcalin. On épuise à l'éther en continu pendant 2 heures, puis la phase éthérée renfermant les DNP-aminoalcools, plus une petite quantité de dinitrophénol et de dinitroaniline (cette dernière ne se formant pas si l'éther est exempt de peroxydes) provenant de la décomposition des DNP-aminoacides, est évaporée sous vide à sec.

Le résidu sec de la phase éthérée est repris dans 5 ml maximum d'alcool à 70 %. On le chromatographie sur une colonne de 1 ou 2 g d'alumine acide [70], en utilisant comme solvant l'alcool à 70 % : le dinitrophénol reste fixé, sous forme d'une bande jaune, dans la partie supérieure de la colonne, alors que les DNP-aminoalcools et la dinitroaniline passent avec quelques ml du filtrat. Ce filtrat est évaporé à sec sous vide ; le résidu sera repris au moment de l'identification des aminoalcools.

4. CARACTERISATION

Les techniques utilisées dépendent du mode d'isolement.

a) PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES AMINOALCOOLS :

Tous les aminoalcools peuvent être séparés et identifiés par chromatographie sur papier. Comme les aminoacides, ils peuvent être révélés par la ninhydrine avec formation d'une tache violacée [71] quoique la réaction soit de 10 à 20 fois moins sensible ; ce traite-

ment se fait en vaporisant sur le chromatogramme sec une solution à 0,2 % de ninhydrine dans le n-butanol. On sèche à nouveau puis chauffe 3 à 5 minutes à l'étuve à 100-105°. Le prolinol, de même que la proline, donne avec la ninhydrine une tache jaune ; pour révéler cet aminoalcool, il est préférable d'utiliser l'isatine qui fournit une tache bleue stable [72].

Le comportement des aminoalcools a été étudié dans divers solvants, parallèlement à celui des aminoacides correspondants. Les résultats obtenus sur papier Whatman n° 1 ont été intéressants lors de l'emploi des quatre solvants suivants (voir *tableau II*) :

I : n-butanol (77) + acide acétique (6) + eau (17) (en volumes).

II : n-butanol saturé d'eau + 0,1 % de NH_3 .

III : phénol saturé d'eau + 0,1 % de NH_3 .

IV : pyridine (60) + collidine (20) + eau (20).

On voit que dans tous ces solvants les R_F des aminoalcools sont supérieurs aux R_F des aminoacides correspondants.

Enfin certains solvants permettent de réaliser la séparation des aminoalcools non distinguables au moyen de ces solvants généraux :

- a) l'emploi de créosol saturé d'eau en atmosphère ammoniacale, permet la distinction entre sérinol (R_F 0,38) et thréoninol (R_F 0,59) ;
- b) l'emploi du mélange pyridine (35) — alcool isoamylique (35) — eau (27) a permis la séparation entre isoleucinol (R_F 0,46), leucinol (R_F 0,49) et phénylalaninol (R_F 0,54).

Ainsi donc il apparaît parfaitement possible, par l'emploi de solvants appropriés, de caractériser sans ambiguïté chacun des aminoalcools.

b) PAR CHROMATOGRAPHIE DES DNP-AMINOALCOOLS :

Pour séparer les DNP-aminoalcools entre eux, il faut faire appel à la chromatographie en « phases inversées » [65]. Dans cette méthode, la phase organique est stationnaire et la phase aqueuse est mobile ; il y a donc inversion par rapport à l'ordre habituel des phases. Pour réaliser une telle inversion, le support de la phase stationnaire (kieselguhr) doit être rendu partiellement hydrophobe par imprégnation avec une silicone. Le kieselguhr (Hyflo-supercel) silicisé est préparé suivant la technique de JUTISZ et coll. [65] : 250 g d'Hyflo-supercel sont d'abord tamisés à travers un tamis de 100, puis mis en suspension dans 1 litre d'acide acétique à 10 % et versés sur bûchner. Le gâteau est lavé avec 2 litres d'acide acétique à 10 %

Tableau II

R_F COMPARÉS DES AMINOALCOOLS ET AMINOACIDES
DANS DIFFÉRENTS SOLVANTS SUR PAPIER WHATMAN N° 1
Temp. 20-22° C

Substance	R _F			Substance	R _F		
	I	II	III		I	II	III
Glycocolle	0,07	0,06	0,33	Proline	0,15	0,14	0,88
Colamine	0,18	0,15	0,74	Prolinol	0,28	0,26	1
Alanine	0,13	0,12	0,56	Phénylalanine . .	0,39	0,44	0,82
Alaninol	0,25	0,23	0,83	Phénylalaninol . .	0,54	0,70	1
Sérine	0,06	0,06	0,32	Tyrosine	0,21	0,24	0,59
Sérinol	0,16	0,15	0,69	Tyrosinol	0,40	0,54	0,81
Thréonine	0,10	0,09	0,48	Ac. aspartique . .	0,05	0,01	0,17
Thréoninol	0,17	0,31	—	Aspartidiol	0,19	0,23	0,85
Valine	0,30	0,24	0,77	Ac. glutamique . .	0,09	0,01	0,23
Valinol	0,40	0,49	1	Glutamidiol	0,21	0,23	0,85
Leucine	0,46	0,44	0,81	Lysine	0,02	0,01	0,53
Leucinol	0,53	0,63	1	Lysinol	0,08	0,07	0,78
Isoleucine	0,44	0,39	0,82	Histidine	0,03	0,07	0,64
Isoleucinol	0,50	0,63	1	Histidinol	0,08	0,12	—
		IV					
Arginine		0,12					
Argininol		0,35					

puis avec de l'eau distillée jusqu'à la neutralité. On essore et on lave avec 300 ml d'acétate d'éthyle. On sèche à l'étuve à 110° pendant une nuit. Ce premier traitement a pour but d'éliminer les impuretés qui souillent habituellement le Hyflo-supercel tel qu'il est livré par le commerce. Le Hyflo-supercel sec est pulvérisé au mortier, puis introduit dans un poudrier de 1 litre bouché à l'émeri ; on verse sur la poudre 750 ml d'une solution à 5 % de Rhodorsil 240 dans le chloroforme et on agite fortement le tout pendant 1 minute. On verse sur büchner puis on retire le gâteau et on l'émiette finement sur papier. On abandonne à l'air jusqu'à évaporation de la majeure partie du chloroforme. Le chloroforme résiduel est éliminé complètement par

lavage à l'alcool et l'acide chlorhydrique libéré par la polymérisation de la silicone est éliminé par lavage à l'eau distillée jusqu'à absence de réaction au nitrate d'argent dans le filtrat. On sèche à l'étuve à 110° pendant 40 heures. Le Hyflo-supercel siliconé, même conservé en flacon bouché, doit être resséché de temps en temps à l'étuve.

La préparation de la colonne s'effectue de la manière suivante : 2 g de Hyflo-supercel siliconé sont malaxés dans un petit mortier en verre avec 0,4 ml de la phase solvant du système. On met cette poudre en suspension homogène dans 14 ml de la phase aqueuse et on verse dans une colonne de 10 mm de diamètre intérieur comportant dans sa partie inférieure un clou en verre recouvert d'une rondelle de papier filtre. En imprimant à l'ensemble un mouvement de rotation, on réalise une colonne aussi homogène que possible et dépourvue de bulle d'air.

Lorsque le ménisque du liquide baignant le Hyflo-supercel touche presque la surface de ce dernier, on introduit au moyen d'une pipette capillaire à extrémité recourbée 0,2 à 0,5 ml de phase aqueuse renfermant en solution 20 à 100 μ g de chaque DNP-aminoalcool. Quand cette solution a pénétré à l'intérieur de la colonne, on développe avec la phase aqueuse. On obtient ainsi une série de bandes jaunes assez fines, qui sont recueillies isolément.

Le *tableau III* montre les R_f de quelques DNP-aminoalcools sur colonne de Hyflo-supercel siliconé. Tous ces composés sont séparés en utilisant des systèmes : acétate de butyle — acide acétique — eau, en proportions variables. La dinitroaniline, résultant de la décomposition des DNP-aminoacides, accompagne toujours à l'état de traces les DNP-aminoalcools ; elle forme une bande de R_f bien déterminés et que l'on peut facilement caractériser.

Le *tableau III* appelle les remarques suivantes :

- 1° Pour obtenir une bonne séparation, la température de la colonne doit être maintenue aux environs de 12-15°. On utilise au besoin des colonnes réfrigérées.
- 2° Le système I est stable et aboutit à la formation de bandes ayant des R_f parfaitement reproductibles.
- 3° Le système II est moins stable, aussi les R_f des bandes sont difficilement reproductibles d'une opération à l'autre. Pour identifier un DNP-aminoalcool inconnu, il est indispensable de préparer d'un même coup une série de colonnes sur lesquelles on pourra comparer à l'œil et mesurer les R_f de la substance inconnue à côté de ceux des DNP-aminoalcools de référence.

Tableau III
R_F DE QUELQUES DNP-AMINOALCOOLS,
SUR COLONNE DE HYFLO-SUPERCEL SILICONÉ
DANS DEUX SYSTÈMES DE SOLVANT

<i>DNP-aminoalcool</i>	R_F	
	<i>I</i>	<i>II</i>
Colamine	0,60	0,91
Alaninol	0,40	0,79
Thréoninol	0,72	1,00
Valinol	0,14	0,45
Leucinol	0,06	0,33
Isoleucinol	0,10	0,40
Aspartidiol	0,81	—
Glutamidiol	1,10*	—
Phénylalaninol	0,07	0,26
Dinitroaniline	0,29	0,56
Système I: Acétate de butyle (10) + acide acétique (20) + eau (100).		
Système II: Acétate de butyle (15) + acide acétique (50) + eau (100).		
*Ce R _F supérieur à 1 est dû probablement à un phénomène de diffusion.		

Chromatographie sur papier :

Afin d'identifier sans erreur possible les DNP-aminoalcools ainsi isolés, on peut alors les soumettre à la chromatographie sur papier. On opère sur papier Schleicher et Schülle 507, par chromatographie descendante, avec emploi du solvant préconisé par TAM [73] : phase organique du système, isooctane (30) — isopropanol (7,5) — eau (1,5). Le chromatogramme est mis en place dans un cylindre fermé par un couvercle de dessiccateur, la gouttière destinée à recevoir la phase organique du solvant étant provisoirement à sec ; dans la partie inférieure du cylindre, on dispose deux récipients contenant chacun quelques ml des deux phases du système ; on laisse la feuille s'imprégner de vapeurs de solvant pendant 5 à 6 heures ; il est essentiel que le cylindre soit parfaitement étanche. Au bout de ce temps d'imprégnation, on introduit la phase solvant du système au moyen d'un entonnoir à robinet traversant le bouchon disposé sur le couvercle ; cette opération ne modifie donc aucunement l'atmosphère à l'intérieur du cylindre.

La chromatographie dure de 16 heures à 24 heures ou plus, selon les DNP-aminoalcools en présence que l'on veut séparer. Les R_F de ces divers DNP-aminoalcools dans ce système sont bien définis et permettent une identification certaine ; le *tableau IV* donne la valeur des R_F de certains de ces dérivés.

Tableau IV
 R_F DE QUELQUES DNP-AMINOALCOOLS,
 SUR PAPIER SCHLEICHER ET SCHÜLLE 507
 DANS LA PHASE ORGANIQUE DU SYSTÈME :
 Isooctane (30) — Isopropanol (7,5) — Eau (1,5)

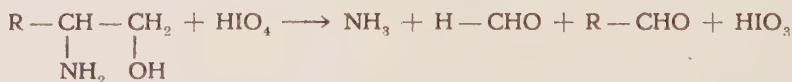
<i>DNP-aminoalcool</i>	R_F
Leucinol	0,71
Phénylalaninol	0,66
Alaninol	0,50
Colamine	0,34
Sérinol	0,23

5. DETERMINATION QUANTITATIVE

Nous avons utilisé deux techniques différentes :

a) DOSAGE PAR L'ACIDE PERIODIQUE :

Les aminoalcools possédant un groupe aminé voisin du groupe hydroxyle, réagissent avec l'acide périodique, ainsi que l'ont montré FLEURY et coll. d'une part [74-79], SHINN et NICOLET d'autre part [80, 81, 82, 83], suivant la réaction :



Pour que cette réaction ait lieu, il est indispensable que les deux fonctions soient portées par 2 atomes de C contigus, et que la fonction alcool soit libre ; enfin à température ordinaire, les acides aminés, acides alcools et diamines subissent une réaction extrêmement lente, négligeable vis-à-vis de celle due aux aminoalcools et dialcools, aussi peut-on considérer cette réaction d'oxydation comme spécifique des aminoalcools.

La réaction de l'acide périodique avec les aminoalcools se fait à la température ordinaire et en milieu nettement alcalin. Nous trouvant en présence de quantités d' aminoalcools comprises entre 10 μg et 100 μg , nous avons dosé l'ammoniaque provenant de la fonction amine par microdiffusion dans des cellules CONWAY [84] et colorimétrie à l'aide du réactif de NESSLER [85].

Mode opératoire :

Dans la partie centrale de la cellule, on place 1 ml d'acide borique à 1 %. Dans la partie périphérique, on place dans l'ordre : la solution d'analyse, 2 ml d'une solution de CO_3K_2 à 50 %, et 1 ml d'une solution de IO_4H 0,2 M. Sitôt l'acide périodique mis, on ferme la cellule et on laisse la microdiffusion se faire pendant 4 heures à la température ordinaire. Après ce temps, on place la solution centrale dans un ballon jaugé de 5 ml en rinçant la cuvette quatre fois par 0,5 ml d'eau. On ajoute 0,5 ml du réactif de Nessler, on porte au volume et on lit la coloration au spectrophotomètre, à la longueur d'onde $\lambda = 400 \text{ m}\mu$. L'échelle de correspondance est établie lors de chaque dosage en procédant de même, la solution d'analyse étant remplacée successivement par 1 ml et 2 ml d'une solution standard de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ contenant 10 μg N_2/ml (titre exact vérifié par KJELDAHL).

b) COLORIMÉTRIE DES DNP-AMINOALCOOLS :

Dans tous les cas où nous avons caractérisé les aminoalcools sous forme de leurs dérivés DNP, nous avons pu utiliser le spectre d'absorption caractéristique de ces dérivés colorés pour en obtenir le dosage photométrique. Les mesures ont été faites au spectrophotomètre de Beckman entre 300 et 400 $\text{m}\mu$. Les spectres obtenus étant relativement caractéristiques (voir *tableau V* et *figure 2*, pp. 30-31), nous avons ainsi obtenu un critère supplémentaire de pureté des DNP-aminoalcools.

Tableau V

POSITIONS ET VALEURS DES MAXIMA ET MINIMA
DES BANDES D'ABSORPTION DE QUELQUES DNP-DÉRIVÉS

$\varepsilon^* \cdot 10^{-4}$			
λ (m μ)	DNP-Phénylalaninol (Syst. II**)	DNP-Colamine (Syst. I**)	2-4-Dinitroaniline (Syst. I**)
400	0,776	0,805	0,69
380	1,23	1,20	0,76
360	1,66	1,62	1,10
359	1,67 M	1,63 M	
358	1,66	1,62	
355	1,63	1,60	
350	1,56	1,51	1,26
345			1,28 M
340			1,25
330	0,920	0,88	0,105
310	0,386	0,35	0,49
305	0,325	0,28	
300	0,297 m	0,25 m	0,31
295	0,32	0,27	0,262 m
290	0,37	0,32	0,28
270	0,89	0,85	0,705
264	0,978	0,917	0,855
263		0,92 M'	
262		0,917	0,86
260	1,01	0,91	0,87 M'
257 1/2 ..	1,015 M'		0,85
255	1,01		
250	0,98	0,844	0,74

* ε : Coefficient d'absorption moléculaire

**Syst. II : Phase aqueuse du système : acétate de butyle (15) — acide acétique (50) — eau (100).

Syst. I : Phase aqueuse du système : acétate de butyle (10) — acide acétique (20) — eau (100).

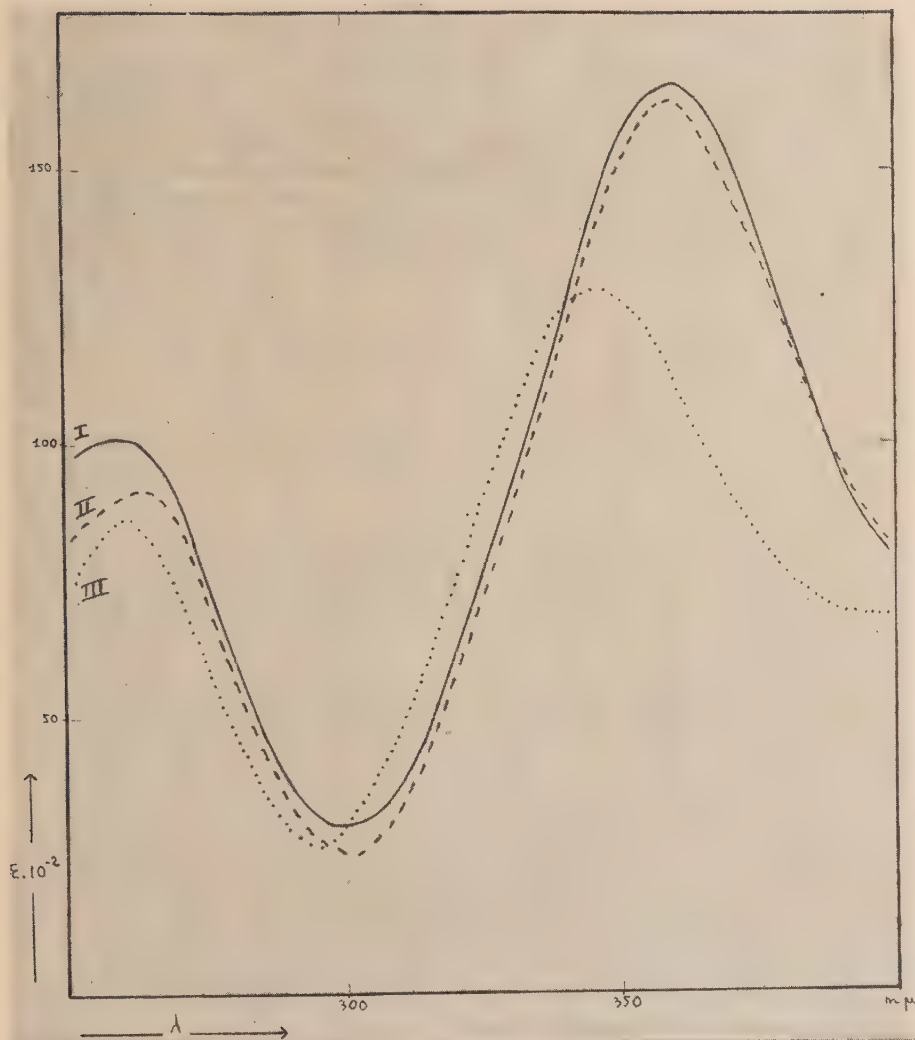


FIGURE 2: Spectres

- I: DNP-Phénylalaninol — dans Système II
- II: DNP-Colamine — dans Système I
- III: 2-4-Dinitroaniline — dans Système I



TROISIÈME PARTIE

CAS DES PEPTIDES

I. — Réduction au moyen de LiAlH_4 ,

Il nous a paru intéressant d'étudier systématiquement l'action de LiAlH_4 sur des « modèles peptidiques », constitués par des benzoyl-aminoacides, et sur quelques benzoyldipeptides. Le but de ce travail était tout d'abord d'élucider le comportement de la liaison peptidique — $\text{CO} - \text{NH} -$ au cours d'une réduction et ensuite de réaliser, avec un bon rendement, la réduction du carboxyle terminal d'un peptide en l'alcool primaire correspondant, en évitant des réactions secondaires.

Les deux types de réactions secondaires que nous pouvions craindre étaient les suivants :

1° Réduction des carbonyles peptidiques :



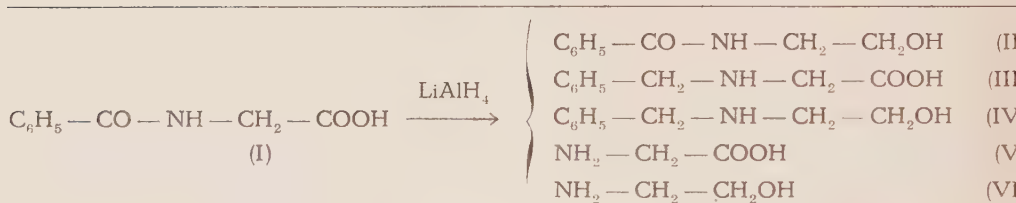
2° Rupture des liaisons peptidiques :



La réduction des amides aliphatiques et aromatiques par LiAlH_4 a été étudiée par divers auteurs [51, 86]. En général, les amides sont réduites en les dérivés aminés correspondants avec un bon rendement, à condition de chauffer le milieu de réaction pendant un temps relativement long. KARRER et NICOLAUS [87] ont réussi d'autre part à réduire dans le tétrahydrofurane à ébullition, les carbonyles peptidiques — $\text{CO} - \text{NH} -$ de quelques dipeptides en amines secondaires correspondantes. Quant à la deuxième réaction secondaire envisagée, elle a été également observée avec des amides [88, 89] et on constate que la facilité de coupure dépend de la nature du substituant côté N-amidé.

Quoique la vitesse de ces réactions soit moins grande que celle de la réduction des carboxyles libres ou estérifiés [51], et qu'elles nécessitent souvent une température plus élevée, elles constituaient au premier abord, pour nous, une difficulté puisqu'elles faisaient craindre des réactions secondaires dans le cas de la réduction du carboxyle terminal d'un peptide. Considérons en effet, le cas le plus simple étudié, celui du benzoylglycocolle (*tableau VI, I*) : suivant que la réduction porte sur la fonction amide ou sur le carboxyle, elle peut engendrer les produits suivants, les produits III à VI réagissant tous à la ninhydrine :

Tableau VI
PRODUITS POUVANT SE FORMER
LORS DE LA RÉDUCTION DU BENZOYLGLYCOCOLLE



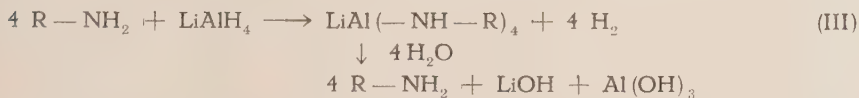
L'étude de la réduction de ce modèle simplifié a rendu possible l'évaluation, en fonction de la température et du temps, de l'importance de chacune de ces réactions conduisant à la formation des cinq produits cités plus haut et qui ont tous été identifiés dans le mélange réactionnel hydrolysé ou non, par chromatographie sur papier. Les résultats ainsi obtenus nous ont permis de modifier ultérieurement nos conditions opératoires de façon à limiter au maximum les réactions conduisant à la formation des produits III, IV, V et VI considérées comme réactions secondaires au profit de la réaction principale donnant naissance au produit II.

A. — PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les acides aminés et les peptides utilisés dans ce travail proviennent des laboratoires Hoffmann La Roche (Bâle, Suisse). Seule la glycylalanine n'existant pas dans le commerce, a été synthétisée par nous selon la méthode de FISCHER [90].

1. BENZOYLATION ET ESTERIFICATION

Dans tous les cas, nous avons préféré acyler le groupe aminé de nos produits plutôt que de le laisser libre. En effet, ce groupe se combine à LiAlH_4 avec élimination d'hydrogène suivant la réaction :



la combinaison formée étant bien décomposée en présence d'eau mais pouvant, par sa proximité, gêner partiellement la réaction principale de réduction du carboxyle (voir *réaction I*, p. 16). Et d'autre part, nous opérons essentiellement sur des carboxyles estérifiés, ceux-ci étant plus facilement réductibles par LiAlH_4 (voir *réaction II*, p. 16) ; or l'estérification des acides aminés et peptides se fait avec un rendement d'environ 100 % à condition que leur groupe aminé soit bloqué.

a) LA BENZOYLATION

Elle a été effectuée selon la méthode de SCHOTTEN-BAUMANN [91, 92] : 0,017 M d'un acide aminé est dissout dans 15 ml d'eau. On agite tout en versant par petites portions : 0,13 M de bicarbonate de soude et 0,05 M de chlorure de benzoyle, simultanément. On agite encore pendant une heure puis on acidifie par HCl 2 N. Après avoir laissé la masse réactionnelle pendant la nuit en glacière, on filtre le produit obtenu ; on le lave avec de l'éther isopropylique (V/V) [93] pour éliminer l'acide benzoïque, puis on recristallise à partir d'eau chaude.

S'il s'agit d'un peptide, la technique est légèrement différente : 0,03 M du peptide est dissout dans 150 ml d'eau et on ajoute 0,17 M de carbonate de soude. On agite tout en versant peu à peu 0,09 M de chlorure de benzoyle. On continue l'agitation durant quatre heures puis on opère exactement comme ci-dessus.

La pureté des dérivés benzoylés a été contrôlée par leur point de fusion (*tableau VII*, p. 36) et par chromatographie sur papier avant et après hydrolyse selon les conditions indiquées plus loin.

b) L'ESTÉRIFICATION

Elle a été conduite suivant la méthode de FISCHER et SPEIER [94] : on agite environ 2 mM d'un acide aminé ou d'un peptide benzoylé,

en suspension dans 20 ml de méthanol ou d'éthanol anhydre contenant 0,1 N de HCl sec, à 40° pendant 4 heures. L'alcool est évaporé sous vide et le produit est abandonné au dessiccateur sous vide en présence de KOH solide. Le degré d'estérification est contrôlé par acidimétrie (on titre par NaOH 0,1 N en présence de phénolphtaléine) et par le point de fusion des produits obtenus (*tableau VII*): l'estérification est pratiquement quantitative.

Tableau VII

POINTS DE FUSION DE DIVERS BENZOYLAMINOACIDES ET BENZOYLPEPTIDES
ET DE LEURS ESTERS

	P.F. (°C)	
	<i>trouvé</i>	<i>d'après BEILSTEIN</i>
Benzoylglycocolle	185,5	187
Benzoyl-dl-alanine	160	162
Benzoyl-dl-leucine	133	135
Benzoylglycyl-dl-alanine	203	202
Benzoyl-dl-alanylglycocolle	166	166
Benzoyl-dl-leucylglycocolle	164	167
Benzoylglycocolle, ester méthylique	80 - 80,5	80,5
Benzoyl-dl-alanine, ester méthylique	79,5 - 80	80,5 - 81,5
Benzoyl-dl-leucine, ester méthylique	95 - 95,5	95 - 96
Benzoylglycyl-dl-alanine, ester éthylique	124	124 - 126
Benzoyl-dl-alanylglycocolle, ester méthylique	110 - 110,5	
Benzoyl-dl-leucylglycocolle, ester méthylique	174	

2. REDUCTION

La réduction est effectuée dans l'appareil déjà décrit à propos des techniques utilisées (voir p. 19). On dissout 0,2 à 0,3 mM du produit à réduire, finement broyé et parfaitement séché à 60° sous vide, dans 3 ml de tétrahydrofurane anhydre. Cette solution est versée goutte à goutte, en agitant dans une atmosphère d'azote, sur une suspension de 0,8 à 2,2 mM de LiAlH₄, finement broyé, dans 3 à 5 ml de tétrahydrofurane: on calcule la quantité de LiAlH₄, nécessaire à un excès de huit à dix fois (voir *réactions I* et *II*, p. 16). L'agitation dans une atmosphère d'azote est maintenue pendant toute la durée de la réaction; et, selon le cas, le ballon à réaction est chauffé au bain-marie ou refroidi dans la glace fondante. A la fin

on décompose l'excès d'hydrure double en ajoutant 1 ou 2 gouttes d'éthanol aqueux, le mélange réactionnel étant maintenu au froid. On évapore à sec sous vide. Le résidu est repris par l'eau et amené à pH 7 avec de l'acide chlorhydrique 0,1 N. On filtre à chaud et lave le précipité abondamment à l'eau chaude. Finalement, on amène ce filtrat à 25 ml (solution A).

3. DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL

On vérifie par le dosage de l'azote total (KJELDAHL) que la solution A contient la totalité des produits azotés, autrement dit qu'il n'y a pas eu de perte lors de l'opération de filtrage précédente. On opère sur des prises de 2 ml de la solution A.

4. HYDROLYSE

5 ml de la solution A sont additionnés de 5 ml d'acide chlorhydrique 11 N; on hydrolyse à 100°, en tube scellé, pendant 24 heures. On chasse l'acide chlorhydrique en excès par des concentrations sous vide successives, alternant avec des additions d'eau distillée. Finalement, on reprend par l'eau et amène à 5 ml (hydrolysate A).

5. PREMIERE METHODE DE DOSAGE ET D'IDENTIFICATION

Dans cette première méthode, nous avons opéré comme suit :

a) LE DOSAGE :

Le dosage des α -aminoalcools primaires formés au cours de la réduction a été effectué par action de l'acide périodique sur la solution A (prise de 1 ml) et sur l'hydrolysate A (prise de 0,2 ml); la réaction à l'acide périodique est effectuée en cellule de Conway selon la technique décrite précédemment (voir pp. 28-29). Dans le premier cas, le chiffre obtenu indique le taux de la réaction VI du *tableau VI* (aminoalcool formé durant la réduction par suite d'une coupure); dans le deuxième cas, le chiffre obtenu indique le taux de cette réaction VI, augmenté de celui de la réaction II (par hydrolyse il y a eu libération de l'aminoalcool). Par différence de ces deux chiffres, on obtient le taux de la réaction II, réaction qui correspond à la réduction du benzoyl-acide aminé ou -peptide en benzoyl-aminoalcool ou -peptidol correspondant (*tableau VI*, p. 34).

b) L'IDENTIFICATION :

L'identification des aminoalcools a eu lieu par chromatographie sur papier. Dans ce but, une partie de la solution A est débarrassée de ses sels par chromatographie sur Permutite 50 [62]. On verse 10 à 15 ml de la solution A sur une colonne de 1 g de Permutite 50 forme H^+ , et on les fait suivre d'environ 50 ml d'ammoniaque 0,1 N. On recueille l'ensemble du filtrat et on l'évapore plusieurs fois sous vide, de façon à chasser l'excès d'ammoniac, et finalement on amène à un volume connu avec de l'eau (solution A déminéralisée). Cette solution étant utilisée uniquement pour la chromatographie, la petite quantité de NH_4Cl qu'elle contient n'est pas gênante.

Une partie de cette solution A déminéralisée est additionnée de son volume d'acide chlorhydrique 11 N puis hydrolysée à 100° en tube scellé pendant 24 heures. On chasse l'excès d'acide chlorhydrique par évaporations successives sous vide et on reprend finalement par l'eau (hydrolysate A déminéralisé).

La solution A déminéralisée et son hydrolysate ont été examinés par chromatographie sur papier en vue de l'identification des produits de réaction.

Toutes les chromatographies ont été effectuées sur papier Whatman n° 1 avec pour solvant le mélange : butanol (77) — acide acétique (6) — eau (17), la révélation des taches étant faite à la ninhydrine. Dans ces conditions, ni les benzoylaminoacides ni les benzoylaminoalcools ne se révèlent ; les aminoacides et les aminoalcools donnent une coloration violette ; la N-benzylcolamine, l'acide N-benzylaminoacétique et leurs homologues supérieurs donnent des taches jaunes qui deviennent violettes au bout de quelque temps.

Dans le cas du benzoylglycocolle et de son ester méthylique (tableau VI), les produits de réactions secondaires comme la N-benzylcolamine et l'acide N-benzylaminoacétique ont été estimés d'une façon approximative par comparaison visuelle des taches qu'ils donnent sur un chromatogramme, avec celles fournies par des quantités connues des mêmes produits de synthèse. Les R_F de ces deux produits sont les suivants :

Acide N-benzylaminoacétique, $R_F = 0,37$

N-benzylcolamine, $R_F = 0,45$

On remarque que, comme dans le cas d'un acide aminé et de son aminoalcool correspondant, le deuxième R_F est plus élevé que le premier.

6. DEUXIEME METHODE D'IDENTIFICATION ET DE DOSAGE

Cette seconde méthode consiste à doser les aminoalcools formés sous forme de leurs dérivés N-dinitrophénylés [65]. Nous l'avons uniquement utilisée dans le cas de benzoyldipeptides estérifiés pour déceler une coupure éventuelle de la liaison peptidique, les réactions du type III et IV (*tableau VI*, p. 34) pouvant alors être considérées comme pratiquement nulles.

a) FORMATION DES DNP-AMINOALCOOLS :

Une prise de 1 ml de l'hydrolysate A est portée à 5 ml dans un ballon jaugé. On en prélève 1 ml (ce qui correspond à 1,6 - 2,4 μ M du peptide initial) et cette prise est neutralisée par du bicarbonate solide. On traite alors par le FDNB selon la technique précédemment décrite (voir pp. 22-23). Après la chromatographie sur une colonne de 1 g d'alumine acide, le filtrat alcoolique contenant les DNP aminoalcools et la dinitroaniline est repris par la phase aqueuse du système : acétate de butyle (10) — acide acétique (20) — eau (100), de façon à l'amener à 1 ml.

b) CARACTÉRISATION ET DOSAGE DES DNP-AMINOALCOOLS :

Une prise de 0,5 ml est alors chromatographiée sur une colonne de 2 g de Hyflo siliconé [65] en présence de ce même solvant, comme on l'a décrit p. 26. On mesure les R_f des différentes bandes observées, et on les identifie ainsi que nous l'avons vu précédemment, par comparaison avec les R_f obtenus avec des chromatographies témoins. Ces bandes sont recueillies séparément, ajustées à 10 ml avec la phase aqueuse du système, puis dosées au spectrophotomètre de Beckman à 350 et 400 m μ .

c) AUTRES MÉTHODES DE CARACTÉRISATION DES DNP-AMINOALCOOLS :

L'identité des DNP-aminoalcools peut encore être vérifiée par chromatographie sur papier. Les solutions correspondant aux différentes bandes, une fois dosées, sont mises en capsules et évaporées à sec sous vide. Les résidus ainsi obtenus sont soumis à la chromatographie descendante sur papier Schleicher et Schülle 507 et dans le système iso-octane (30) — isopropanol (7,5) — eau (1,5), selon le processus déjà décrit (voir p. 27).

B. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. RÉDUCTION DU BENZOYLGLYCOCOLLE ET DE SON ESTER MÉTHYLIQUE

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le *tableau VIII*.

Tableau VIII

RÉDUCTION DU BENZOYLGLYCOCOLLE ET DE SON ESTER MÉTHYLIQUE

SUBSTANCE RÉDUITE	TEMPÉ- RATURE (°C)	TEMPS (min.)	POUR CENT DES PRODUITS DE RÉACTION			
			Benzoyl- colamine (Réact. II)	Benzyl- glycocolle (Réact. III)	Benzyl- colamine (Réact. IV)	Colamine (Réact. VI)
Benzoylglycocolle	65	30	5	10	10	14
		240	1	0	42	30
Benzoylglycocolle, ester méthylique	0	10	19	0	0	1,5
		30	45	0	1-2	3
		120	57	0	4-5	5

Il apparaît que :

- Le traitement du benzoylglycocolle à la température ordinaire par LiAlH_4 pendant des temps variant de 30 minutes à 2 heures, ne produit aucun effet sensible. Les chromatographies sur papier des hydrolysats du benzoylglycocolle, ainsi traités, ne révèlent que des traces de colamine.
- Si ce traitement est effectué à la température d'ébullition du tétrahydrofurane (65°), on observe au bout de 30 minutes de réaction une faible quantité de benzoylcolamine (*réaction II*, *tableau VI*), alors que la réduction du carbonyle d'amide, avec formation de benzylglycocolle et de benzylcolamine (*réactions III et IV*, *tableau VI*), atteint un rendement de 10 % en chacun de ces produits (*tableau VIII*). Si le rendement en benzoylcolamine est si faible, c'est probablement que cette dernière subit, au cours de la réduction, une coupure au niveau de son carbonyle avec libération de la colamine (*réaction VI*, *tableau VI*). Le milieu de la réaction étant anhydre, cette coupure ne peut être de nature

hydrolytique ; elle s'explique par contre fort bien suivant le deuxième type de réactions secondaires envisagé au début de ce chapitre.

- c) En prolongeant le temps de réduction, à 65°, jusqu'à 2 heures, on observe une disparition presque complète de la benzoylcolamine et du benzylglycocolle, ainsi qu'une formation accrue de la benzylcolamine (42 %) et de la colamine (30 %) (*tableau VIII*). Il en résulte que si l'augmentation de la température est favorable à la réduction du groupe carboxylique libre, elle l'est également à la réduction du carbonyle d'amide (*réaction IV, tableau VI*) et probablement à la coupure de la liaison peptidique (*réaction VI, tableau VI, p. 34*).
- d) Du fait de la faible activité de LiAlH_4 sur les carboxyles à température ordinaire (voir ci-dessus), pour pouvoir travailler à 0°, nous avons dû estérifier le benzoylglycocolle, les esters réagissant plus facilement avec l'hydruire double que les groupes carboxyliques libres [10]. L'ester méthylique du benzoylglycocolle réduit à 0°, donne la benzoylcolamine avec un rendement qui, de 19 % en 10 minutes, atteint 57 % en 2 heures. La réduction du carbonyle d'amide et la coupure de la liaison peptidique ne se font, dans ces conditions, que dans de faibles proportions ne dépassant pas quelques pour cent en 2 heures (*tableau VIII*).

2. REDUCTION DES CARBOXYLES TERMINAUX DES BENZOYL-AMINOACIDES ET DES BENZOYLPEPTIDES ESTERIFIES

Ayant ainsi déterminé les conditions optimum dans lesquelles la réaction du type II (*tableau VI*) a lieu et les autres réactions sont limitées au maximum, nous avons traité par LiAlH_4 à 0° quelques benzoyl-aminoacides et -peptides estérifiés. Les résultats de cette étude ont été rassemblés dans le *tableau IX, p. 42*.

En examinant ce tableau, on remarque que dans le cas des acides aminés, le rendement de la réduction augmente avec le poids moléculaire. Le dérivé du glycocolle mis à part, la réduction des esters de la benzoylalanine et de la benzoylleucine, atteint presque son maximum déjà après 10 minutes de réaction. En ce qui concerne les dérivés des peptides, le rendement de la réduction n'augmente également que très peu en fonction du temps, entre 30 minutes et 2 heures de réaction. Dans ce dernier cas, on remarque que les chiffres obtenus par dosage au moyen de l'acide périodique sont toujours supérieurs à ceux établis par chromatographie des DNP-aminoalcools. Ce désaccord est probablement dû au fait que la réaction entre l'acide

périodique et les aminoalcools n'est pas tout à fait spécifique, de sorte qu'une partie de l'ammoniac, engendré et dosé en fin de réaction, provient probablement de l'attaque de l'acide aminé par l'acide périodique.

Dans tous les cas à 0°, les réactions secondaires de réduction du carboxyle peptidique et de coupure de la liaison peptidique, sont très faibles et ne dépassent jamais 5 %.

Tableau IX

RÉDUCTION DES CARBOXYLES TERMINAUX DES BENZOYLAMINOACIDES
ET DES BENZOYLPEPTIDES ESTÉRIFIÉS A 0° C

SUBSTANCE RÉDUITE	TEMPS (min.)	RENDEMENT % DE LA RÉDUCTION DÉTERMINÉ PAR		REMARQUES
		Acide periodique	Méthode chromatographique (DNP-aminoalcools)	
Benzoylglycocolle, ester méthylique	10	19		
	30	45		
	120	57		
Benzoylalanine, ester méthylique	10	69		
	30	72		
	120	73		
Benzoylleucine, ester méthylique	3	86		
	10	89		
	20	90		
	30	90		
	120	90		
Benzoylglycylalanine, ester éthylique	30	69	59	
	120	71		
Benzoylalanylglycocolle, ester méthylique	30	60	58	traces
	120	66	60	d'alaninol
Benzoylleucylglycocolle, ester méthylique	30	82	65	traces
	120	84	74	de leucinol

Il est intéressant de noter que ces résultats ont été confirmés par les travaux de CRAWHALL et ELLIOTT [68]. Ces auteurs ont utilisé l'hydruce double de lithium et d'aluminium pour réduire des benzoyl-glycylpeptides estérifiés et l'ester méthylique du benzoylglycocolle. En opérant à la température d'ébullition du tétrahydrofurane, ils observent, par examen des produits obtenus après hydrolyse, deux réactions secondaires : réduction du groupe amidé et coupure de la liaison peptide ; mais en travaillant à température ordinaire ou à 0°, cette dernière réaction est totalement supprimée.

Ainsi l'ensemble de tous ces résultats nous montre que, dans le cas des dérivés benzoylés d'acides aminés ou de peptides, il faut opérer sur des molécules estérifiées, et à basse température : dans ces conditions seulement la réduction au moyen de LiAlH_4 , du carboxyle terminal en alcool correspondant, se fait avec un bon rendement, les deux types de réactions secondaires envisagées étant alors négligeables. Nous verrons, lors du cas des protéines, les enseignements que nous avons pu tirer de cette étude sur les peptides.

II. — Réduction au moyen de LiBH_4

A. — APERÇU HISTORIQUE

Si on examine ce qui a été fait dans le domaine des acides aminés et peptides, par réduction au moyen du borohydrure de lithium, on constate une certaine discordance entre les divers résultats obtenus. Il faut toutefois noter que CHIBNALL et REES [95] ont été les premiers à utiliser cet hydrure double, mais leurs travaux n'ont porté que sur l'insuline.

C'est en 1953 que GRASSMANN et coll. [66] publient les résultats d'un travail sur la détermination des acides aminés C-terminaux des peptides, par réduction du groupe carboxylique au moyen de LiBH_4 : leur étude porte sur différents esters méthyliques de N-acétyldipeptides, la réduction durant 30 heures à 75-80° avec comme solvant le tétrahydrofurane ; en aucun cas ils n'observent d'autre phénomène que celui correspondant à la réduction du carboxyle estérifié avec formation de l'aminoalcool correspondant, ce dernier étant obtenu avec un rendement de 80-90 %. Par la suite, GRASSMANN et coll. [67] obtiennent un résultat identique avec les esters méthyliques de N-benzoylaminoacides et de N-acétyltripectides. En opérant de la même façon sur des acides aminés et des peptides non estérifiés, ils

n'observent qu'un rendement très faible en DNP-aminoalcools correspondants : 1 % dans le cas des acides aminés, 2 à 6 % dans le cas des dipeptides, à l'exception de ceux ayant une phénylalanine C-terminale, où le rendement atteint 8 à 11 %. Toutefois, tout récemment, GRASSMANN et coll. [96] ont étudié la réduction de divers di- et tripeptides estérifiés selon différentes méthodes : chaque fois que l'estérification est effectuée au moyen de méthanol-HCl ou méthanol-anhydride acétique, ils constatent des coupures dans la chaîne peptidique, en particulier au niveau du glycolle engagé par son carboxyle (formation de 3 à 24 % de DNP-colamine); mais chaque fois qu'ils utilisent le diazométhane comme agent d'estérification, ils observent uniquement la formation de l'aminoalcool correspondant à l'acide aminé C-terminal, le rendement étant d'environ 80 %.

En 1956, CRAWHALL et ELLIOTT [68] étudient la réduction de l'ester méthylique de la N-benzoylglycylalanine :

- a) Par réduction à 0° pendant 18 heures, en solution tétrahydrofurane M/4 en LiBH_4 , et par étude des produits obtenus après hydrolyse, ils constatent uniquement la présence de glycolle et d'alaninol, identifiés tous deux sous forme de leurs dérivés DNP.
- b) Par réduction à la température d'ébullition du tétrahydrofurane, ils observent l'apparition d'un corps supplémentaire dont le comportement est identique à celui de la DNP-colamine.

Quant à LEGGETT BAILEY [97], en réduisant des peptides estérifiés au moyen de LiBH_4 et en dosant directement dans le milieu les β -hydroxyamides formées, il conclut que : si l'on diminue la quantité de solvant utilisé de façon à travailler en solution tétrahydrofurane M vis-à-vis de LiBH_4 , les peptides estérifiés se dissolvent ; dans ces conditions il y a uniquement réduction du groupe ester, cette réduction atteignant jusqu'à 90 % en travaillant pendant 17 heures à la température ambiante.

Il semble donc que la réduction des peptides au moyen de LiBH_4 n'est pas aussi simple que l'on pouvait s'y attendre, en se basant sur les travaux de GRASSMANN et coll. [66, 67].

B. — PARTIE EXPÉRIMENTALE

Après avoir appliqué la technique de GRASSMANN à une protéine estérifiée et avoir ainsi observé un grand nombre de coupures, il nous a paru intéressant d'étudier l'action de LiBH_4 sur quelques benzoyl- ou acyl-dipeptides ou leurs esters, en opérant dans des conditions plus douces de température.

1. ACYLATION ET ESTERIFICATION

Les benzoylpeptides ou leurs esters, qui ont été utilisés, sont les mêmes que ceux qui nous ont servi lors de l'étude de la réduction au moyen de LiAlH_4 (voir pp. 35-36).

Quant à l'acétylpeptide estérifié utilisé : l'ester méthylique de la N-acétylglycylalanine, nous l'avons synthétisé à partir de glycylalanine par action de méthanol et d'anhydride acétique, selon le procédé utilisé par GRASSMANN pour l'obtention de dérivés similaires [66]. La pureté du produit obtenu a été vérifiée par analyse¹⁾, ce qui a donné :

	C (%)	H (%)	N (%)
Théorique	47,5	6,92	13,85
Trouvé	47,25	{ 6,85 6,95	{ 14,25 13,85

2. REDUCTION

Les réductions portant sur 0,2 mM environ du dérivé sont effectuées dans l'appareil déjà décrit (voir schéma p. 19) ; seules les conditions opératoires (durée de la réduction, excès de réducteur, température et molarité de la solution de tétrahydrofurane en LiBH_4) varient selon les cas. A la fin de la réaction, on décompose l'excès de LiBH_4 par adjonction d'environ 6 ml d'éthanol et quelques gouttes d'eau, le ballon à réaction étant refroidi dans de la glace fondante. On évapore à sec sous vide.

3. HYDROLYSE

Le produit sec est hydrolysé par 8 à 10 ml de HCl 6 N, à reflux, pendant 20-24 heures. On élimine l'excès de HCl de l'hydrolysate par évaporations successives, alternant avec des additions d'eau distillée. Finalement on reprend par l'eau et amène à 20 ml (hydrolysate A).

4. DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL

On vérifie par ce dosage (KJELDAHL) que l'hydrolysate A contient la totalité du produit azoté. On opère sur des prises de 2 ml.

⁽¹⁾ L'analyse a été effectuée par les soins du Laboratoire Rhône-Poulenc.

5. IDENTIFICATION ET DOSAGE

La méthode utilisée ici est celle de l'isolement des aminoalcools au moyen de leurs dérivés DNP ; nous procédons de façon tout à fait semblable à celle utilisée lors de la réduction par LiAlH_4 (voir p. 39) : une prise de 1 ml de l'hydrolysate A est portée à 5 ml dans un ballon jaugé ; on en prélève alors 1 ml (ce qui correspond à 2 μM du peptide initial) et on suit le processus habituel.

C. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. RÉDUCTION À 35° PENDANT 30 HEURES L'EXCES DE LiBH_4 ÉTANT D'ENVIRON 10 FOIS

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le *tableau X*.

Tableau X

RÉDUCTION DE DIVERS BENZOYLPEPTIDES ET DE LEURS ESTERS.
À 35° C, PENDANT 30 HEURES

Dérivé	Molarité de la solution THF* en LiBH_4	Rendement en % déterminé par la méthode DNP
Benzoylglycylalanine, ester éthylique	M/10	Alaninol 42
		Colamine 41
Benzoylalanylglycocolle, ester méthylique	M/10	Colamine 48
		Alaninol 20
Benzoylleucylglycocolle, ester méthylique	M/4	Colamine 60,4
		Leucinol 50,3
Benzoylglycylalanine	M/7	Alaninol 6,3
		Colamine 17
	M/6	Alaninol 7,3
		Colamine 8,6
Benzoylalanylglycocolle	M/4	Colamine 10,4

* THF : tétrahydrofurane

Il apparaît que :

- a) Dans tous les cas, sauf un, il se produit une coupure au niveau de la liaison peptidique.
- b) Cette coupure est beaucoup plus importante dans le cas des dérivés estérifiés, mais il faut noter qu'il en est de même du rendement de la réduction du groupement C-terminal.
- c) Par comparaison entre les résultats obtenus, on constate la plus grande fragilité de la chaîne peptidique en le point où le glycolle est engagé par son carboxyle.

2. REDUCTION A TEMPERATURE AMBIANTE PENDANT 17 HEURES L'EXCES DE LiBH_4 ETANT D'ENVIRON 5 FOIS

Nous avons opéré ici suivant la technique de LEGGETT BAILEY : l'ensemble du mélange réactionnel formant une solution claire, il est inutile d'agiter. Le résultat obtenu est le suivant :

Dérivé	Molarité de la solution THF en LiBH_4	Rendement en % (DNP)
Benzoylglycylalanine, ester éthylique	M	Alaninol 60

Nous constatons effectivement l'absence de réactions secondaires, la réduction du groupement ester se faisant avec un assez bon rendement qui est, en tous cas, supérieur à celui observé lors des essais précédents.

3. REDUCTION PENDANT 30 HEURES DE L'ESTER METHYLIQUE DE LA N-ACETYLGLYCYLALANINE SELON DEUX MODES DIFFERENTS

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le *tableau XI*, p. 48.

Ces résultats nous montrent que :

- a) Il y a toujours une coupure au niveau de la liaison peptidique.
- b) Les dérivés acétylés se réduisent beaucoup moins facilement que les dérivés benzoylés correspondants.

Tableau XI

RÉDUCTION DE L'ESTER MÉTHYLIQUE
DE LA N-ACÉTYLGLYCYLALANINE, PENDANT 30 HEURES

Conditions expérimentales utilisées	Molarité de la solution THF en LiBH_4	Rendement en % (DNP)	
Réduction à 35°C	M/2,5	Alaninol	9,4
Excès de LiBH_4 10 fois		Colamine	3,1
Réduction à 75-80°C		Alaninol	19
Excès de LiBH_4 75 fois (technique Grassmann [66])	2 M	Colamine	6

* *

Il semble donc bien que, dans le cas de l'emploi de LiBH_4 , la solubilité des réactifs joue un grand rôle tant du point de vue du rendement de la réduction du groupement ester, que de celui de la coupure de la liaison peptidique : ce principe énoncé par LEGGETT BAILEY se trouve en effet confirmé par nos résultats. Pour éviter tout risque de coupure, il faut opérer à basse température et en milieu soluble, ce qui paraît difficilement applicable aux protéines. D'autre part, l'emploi de LiBH_4 entraîne la formation intermédiaire de complexes du bore avec les produits de réactions, rendant leur isolement à partir du milieu réactionnel brut beaucoup plus laborieux. Il ressort de ces remarques que l'utilisation de LiBH_4 n'apparaît nullement préférable à celle de LiAlH_4 , bien au contraire.

QUATRIÈME PARTIE

CAS DES PROTEINES

Dans le cas de la réduction des protéines, les deux réactions secondaires : réduction des carbonyles peptidiques et rupture des liaisons peptidiques, envisagées précédemment (voir p. 33) sont toujours à craindre. Il faut néanmoins remarquer que la première de ces réactions ne sera gênante que si elle se produit au niveau de la liaison peptidique adjacente à l'acide aminé C-terminal.

Dans le but de limiter au maximum ces réactions secondaires, il semble, en se basant sur nos observations relatives aux peptides, que le mieux est de travailler à basse température sur une molécule estérifiée, principe que nous avons appliqué à l'hormone de croissance et à l'insuline.

I. — Hormone de croissance

A. — GÉNÉRALITÉS

D'après les travaux récents de Li et coll., la molécule de l'hormone de croissance (somatotropine) comporte deux chaînes peptidiques ayant l'alanine et la phénylalanine en position N-terminale [98, 99], et la phénylalanine en position C-terminale [22]. Cette dernière détermination ayant été faite au moyen de la carboxypeptidase, il a été démontré que deux résidus de phénylalanine sont libérés par action de cet enzyme sur l'hormone de croissance. Un doute subsiste cependant sur la provenance de ces deux résidus de phénylalanine : ils peuvent être libérés soit des deux positions C-terminales de deux chaînes peptidiques, soit d'un enchaînement Phe-Phe C-terminal de la même chaîne. En admettant que cette dernière hypothèse soit juste, la position C-terminale de la deuxième chaîne devrait être occupée par un aminoacide résistant à l'action de la car-

boxypeptidase ; ou bien on peut encore envisager un enchaînement linéaire branché comportant un groupement — COOH terminal d'une part et deux groupements — NH₂ terminaux d'autre part. C'est donc dans le but d'élucider la nature de l'extrémité C-terminale de la somatotropine que nous nous sommes adressés à une méthode chimique.

La méthode de détermination des groupes C-terminaux par réduction au moyen de LiAlH₄ utilisée dans ce travail, si elle présente encore à son état actuel quelques imperfections dues à des réactions secondaires de coupure de la chaîne peptidique, peut donner des renseignements intéressants là où les résultats obtenus au moyen des enzymes sont à contrôler.

B. — PARTIE EXPÉRIMENTALE

REDUCTION AU MOYEN DE LiAlH₄

Tableau XII

COMPOSITION DE L'HORMONE DE CROISSANCE

Composition	Nombre de radicaux par mole de l'hormone	%
N ₂		15,65
Alanine	14	2,7
Arginine	24	18,8
Acide aspartique	35	6,7
Cystine	4	1,7
Acide glutamique	41	7,9
Glycine	24	4,5
Histidine	6	3,3
Isoleucine	14	2,7
Leucine	43	8,3
Lysine	23	8,7
Méthionine	9	1,7
Phénylalanine	24	4,7
Proline	13	2,1
Sérine	24	4,9
Thréonine	23	4,6
Tryptophane	2	0,8
Tyrosine	12	2,6
Valine	16	3,0
N amidé	40	1,2

L'hormone de croissance utilisée dans ce travail a été préparée au laboratoire de C.H. LI à partir du lobe antérieur de l'hypophyse de bœuf [100, 101, 102]. L'homogénéité de cette préparation a été contrôlée récemment par zone-électrophorèse [103], par chromatographie [104] et par analyse des groupes N-terminaux [98, 99]; aucune de ces méthodes n'a permis de déceler d'hétérogénéité.

Dans le but de limiter les réactions secondaires de dégradation de la chaîne peptidique, nous avons travaillé à 35° sur l'hormone estérifiée. Les travaux analytiques récents donnent pour l'hormone de croissance un poids moléculaire de 47.000 et la composition globale en acides aminés, présentée dans le *tableau XII*.

On aura donc à réduire par molécule au maximum :

36 groupes carboxyliques des acides aspartique ou glutamique ;

4 groupes S-S de la cystine ;

2 groupes carboxyliques terminaux (chiffre moyen supposé);

42 groupes réductibles (dont 38 estérifiables).

Puisque, comme on l'a vu (voir *réaction II*, p. 16), une molécule d'hydruire réduit 2 fonctions carboxyliques estérifiées, il faudra théoriquement par molécule d'hormone, 23 molécules de réducteur. En fait il est utile de travailler en présence d'un excès important de réducteur.

1. ESTERIFICATION

La méthode d'estérification utilisée ici a été introduite dans le domaine des protéines par FELIX et REINDEL [105] et son application systématique a été étudiée par FRAENKEL-CONRAT et OLCOTT [106]. D'après ces derniers auteurs, l'estérification de la plupart des groupes carboxyliques des protéines est quantitative en présence de méthanol — HCl 0,02 à 0,1 N, à 22-24°, et en 24 heures. MOMMAERTS et NEURATH [107] dans le cas d'insuline, SAROFF et coll. [108] dans le cas de sérumalbumine, ont d'autre part constaté que cette estérification était quantitative dans le méthanol — HCl 0,1 N à 25° en 24 heures. SAROFF et coll. [108] en étudiant la vitesse de sédimentation de leur préparation de sérumalbumine estérifiée obtenue dans ces conditions, n'ont pas observé d'hétérogénéité et par conséquent pas de dégradation de la chaîne peptidique de cette protéine.

Mode opératoire :

215 mg de l'hormone (séchée sous vide à 60° sur P₂O₅ pendant 8 heures) ont été agités, en suspension dans 30 ml de méthanol-

HCl 0,1 N, sec, à 25°, pendant 24 heures. On précipite la protéine estérifiée par 2 volumes d'éther sec et on centrifuge. On lave le précipité à l'éther et on le sèche. On obtient 200 mg de l'hormone estérifiée.

Le rendement de l'estérification est de 94 %, selon le dosage des groupes méthoxy suivant la méthode de ZEISEL¹.

2. REDUCTION

La réduction est toujours effectuée dans l'appareil déjà décrit (voir p. 19). 155 mg de l'hormone estérifiée ont été traités, en suspension dans 20 ml de N-méthylmorpholine, par 165 mg (excès d'environ 40 fois) de LiAlH_4 à 80 % d'hydrogène actif. L'opération dure 8 heures à 35°; on refroidit alors le mélange à 0° et l'on décompose l'excès de LiAlH_4 par quelques gouttes de morpholine aqueuse. On ajoute 2 volumes d'éther, on centrifuge et on lave le précipité à l'éther jusqu'à disparition de l'odeur de morpholine. La poudre sèche ainsi obtenue est à peu près insoluble dans l'eau. On lave à l'eau refroidie à 0°, pour éliminer LiOH provenant de la décomposition de LiAlH_4 (dans d'autres opérations ce lavage à l'eau a été omis). Le produit sec pèse 435 mg; il est formé de l'hormone réduite mélangée avec $\text{Al}(\text{OH})_3$. La récupération de l'azote à ce stade a été de l'ordre de 86 % par rapport à l'hormone estérifiée.

Un essai de réduction a été fait en utilisant la même technique mais à 60°.

3. IDENTIFICATION ET DOSAGE DES DNP-AMINOACIDES

Pour contrôler s'il n'y a pas eu de rupture de chaînes peptidiques de l'hormone au cours d'un de ces traitements, nous avons utilisé la méthode DNP de SANGER [3]. Sachant que l'hormone de croissance comporte deux chaînes peptidiques terminées respectivement par une phénylalanine et une alanine [98, 99], l'apparition d'un DNP-aminoacide supplémentaire devrait indiquer une rupture. Ce contrôle a été effectué sur l'hormone native, sur l'hormone native réduite par LiAlH_4 , sur l'hormone estérifiée et sur l'hormone estérifiée réduite par LiAlH_4 .

(¹) Cette analyse a été effectuée par les soins du Laboratoire de Micro-analyse Ciba, et nous sommes heureux de remercier M. LEDERER d'avoir bien voulu se charger de transmettre nos échantillons.

a) FORMATION DU DNP :

Les quantités de substances correspondant à environ 30 mg de l'hormone (d'après le dosage de N) sont traitées selon les indications de Li et Ash [98] : le produit additionné de 60 mg de CO_3HNa est dissout dans 0,6 ml d'eau ; on ajoute 60 mg (0,042 ml) de FDNB dans 1,2 ml d'éthanol et on agite pendant 4 heures. On centrifuge et on lave successivement trois fois par l'eau, cinq fois par l'éthanol et trois fois par l'éther. On sèche au dessiccateur durant la nuit.

b) HYDROLYSE DU DNP :

La quantité totale de DNP ainsi obtenue est hydrolysée par 8 ml de HCl 6 N, à reflux pendant 17 heures. L'hydrolysate est refroidi et on extrait 3 fois à l'éther, chaque extrait étheré étant lavé en retour par l'eau. Finalement la fraction étherée totale est évaporée sous vide à sec.

c) IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE :

Ces DNP-aminoacides éthero-solubles, provenant des hydrolysats de la DNP-hormone prélevée aux différents stades indiqués, sont identifiés par chromatographie de partage sur Hyflo-supercel tamponné à pH 7,25 avec comme solvant le mélange chloroforme-méthyléthylcétone (MEtCet)-tampon [109, 110].

Mode opératoire :

2 g d'Hyflo-supercel lavé sec sont saturés avec le tampon phosphate 0,4 M, pH 7,25 (0,5 ml) ; on les met en suspension dans du chloroforme saturé de ce même tampon et on remplit la colonne (colonne de 10 mm de diamètre intérieur comportant dans sa partie inférieure un clou en verre recouvert d'une rondelle de papier) en la tassant fortement. Le résidu de la fraction étherée, repris dans un peu de ce même solvant, est introduit sur la colonne. Par du chloroforme, on élue successivement deux bandes correspondant respectivement à la dinitroaniline et au dinitrophénol. Enfin, à l'aide de mélanges successifs, on peut séparer les différents aminoacides ; ainsi l'emploi de CHCl_3 (50) — MEtCet (50) — tampon, permet de recueillir la DNP-phénylalanine formée ; puis l'emploi de CHCl_3 (30) — MEtCet (70) — tampon, permet de recueillir la DNP-alanine formée ; enfin l'emploi de MEtCet saturée de tampon, permet de recueillir le DNP-glycocolle formé.

d) DOSAGE :

La pureté des DNP-aminoacides isolés ainsi par chromatographie sur Hyflo-supercel est contrôlée et leur dosage est fait d'après leur spectre d'absorption entre 300 m μ et 400 m μ . Comme solvant, nous avons utilisé HCl N sauf pour la DNP-phénylalanine qui, étant peu soluble dans ces conditions, a été dissoute dans CO₂HNa à 1 % [3]. Les chiffres obtenus par ces dosages ont été corrigés pour la destruction des DNP-aminoacides au cours d'une hydrolyse et pour les pertes subies pendant la chromatographie : les facteurs de correction ont été déterminés en traitant une quantité connue d'un DNP-aminoacide, mélangé avec de l'hormone, par HCl, dans les conditions utilisées pour l'hydrolyse, et en dosant le DNP-aminoacide résiduel. Les pertes ainsi constatées sont du même ordre que celles citées par SANGER [3] et par Li et ASH [98], à savoir : 33 % pour la DNP-alanine et la DNP-phénylalanine et 77 % pour le DNP-glycocolle. Les résultats de ces dosages ont été rassemblés dans le *tableau XIII*.

e) IDENTIFICATION DES DNP-AMINOACIDES :

L'identification des DNP-aminoacides a été faite par chromatographie sur papier : les solutions une fois dosées, sont évaporées à sec et les résidus obtenus soumis à la chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1 dans différents solvants, à savoir : 1° phénol - alcool isoamylique - eau [111] pour obtenir un résultat général ; 2° décaline - acide acétique [111] pour pouvoir faire la distinction entre DNP-phénylalanine et DNP-leucine ; 3° cyclohexane - isopropanol - benzoate de K [112] pour faire la distinction entre DNP-glycocolle et DNP-thréonine.

f) RÉSULTATS :

En examinant le *tableau XIII*, nous pouvons constater que :

- 1° Les résultats de Li et coll. [98, 99] ont été confirmés qualitativement et quantitativement en ce qui concerne les groupes N-terminaux de l'hormone.
- 2° La réduction de l'hormone native par LiAlH₄ à 35° pendant 8 heures, conduit à la formation d'environ 1 groupe N-terminal du glycocolle.
- 3° L'estérification de l'hormone dans des conditions apparemment douces (méthanol - 0,1 N HCl à 25° pendant 24 heures) engendre un groupe N-terminal du glycocolle.

- 4° La réduction de l'hormone estérifiée ainsi obtenue, par LiAlH_4 , à 35° pendant 8 heures, engendre un groupe N-terminal supplémentaire du glycolle.
- 5° Cette même réduction à 60° fait apparaître, en même temps que les 2 groupes N-terminaux du glycolle déjà observés à 35°, un résidu N-terminal nouveau de phénylalanine en plus de celui qui existe normalement dans l'hormone.

Tableau XIII

RÉSIDUS N-TERMINAUX DÉTERMINÉS PAR LA MÉTHODE DE SANGER [3]
A DES STADES DIFFÉRENTS DU TRAITEMENT DE L'HORMONE
(Les chiffres sont exprimés en résidus de DNP-aminoacides
par mole de l'hormone, de poids moléculaire 47.000 [98])

	Avant correction		Après correction	
Hormone native :				
DNP-alanine	0,67		1,00	
DNP-phénylalanine	0,69		1,02	
Hormone native réduite à 35° C :				
DNP-alanine	0,77		1,13	
DNP-phénylalanine	0,77		1,13	
DNP-glycolle	0,3 environ		1 environ	
Hormone estérifiée :				
DNP-alanine	0,54	0,62	0,80	0,92
DNP-phénylalanine	0,66	0,66	0,98	0,98
DNP-glycolle	0,20	0,20	0,87	0,87
Hormone estérifiée réduite à 35° C :				
DNP-alanine	0,57		0,85	
DNP-phénylalanine	0,67		1,00	
DNP-glycolle	0,42		1,80	
Hormone estérifiée réduite à 60° C :				
DNP-alanine	0,61		0,91	
DNP-phénylalanine	1,29		1,92	
DNP-glycolle	0,44		1,91	

4. IDENTIFICATION ET DOSAGE DES DNP-AMINOALCOOLS

Les aminoalcools engendrés dans la réduction de l'hormone native et de l'hormone estérifiée ont été isolés de l'hydrolysat de produits réduits sous forme de leurs dérivés DNP.

a) HYDROLYSE :

Les quantités du produit réduit correspondant à 20-25 mg environ de l'hormone ont été hydrolysées dans HCl 6 N à reflux pendant 24 heures. Puis on élimine l'excès de HCl par évaporations successives alternées avec des additions d'eau ; finalement on porte l'hydrolysate à un volume connu : 10 ml.

b) FORMATION DES DNP-AMINOALCOOLS, ISOLEMENT, CARACTÉRISATION ET DOSAGE :

Une prise de 5 à 7 ml de l'hydrolysate est traitée par le FDNB selon la technique précédemment décrite (voir pp. 22-23). Après le passage sur colonne de 2 g d'alumine, le filtrat contenant les DNP-aminoalcools formés, la dinitroaniline et les impuretés qui accompagnent les DNP-aminoalcools dans l'extrait étheré, est évaporé à sec sous vide et repris par la phase aqueuse du système I : acétate de butyle (10) - acide acétique (20) - eau (100), de façon à l'amener à 2 ml.

Une prise de 0,5-0,7 ml, correspondant à l'équivalent de 3-5 mg de l'hormone, est chromatographiée sur une colonne de 2 g de Hyflo-superpel siliciné selon la technique précédemment décrite (voir pp. 24-27), en employant successivement les systèmes acétate de butyle - acide acétique - eau (10 : 20 : 100 et 15 : 50 : 100); on mesure les R_F respectifs des différentes bandes observées. La pureté des DNP-aminoalcools isolés par cette chromatographie est contrôlée et leur dosage est fait d'après leur spectre d'absorption entre 250 $m\mu$ et 400 $m\mu$, directement dans la phase aqueuse du système utilisé pour cette chromatographie : les DNP-aminoalcools présentent, ainsi que nous l'avons dit précédemment (voir pp. 29-31), un spectre d'absorption ayant un maximum à 360 $m\mu$ environ et un minimum à 300 $m\mu$ environ, et sont faciles à identifier.

Les chiffres obtenus au cours de ces dosages ont été corrigés pour les pertes subies pendant la synthèse, l'extraction et la chromatographie des DNP-aminoalcools. Les pertes ainsi constatées sont de 8 % pour la DNP-colamine et de 5 % pour le DNP-phénylalaninol. Aucune correction n'a été effectuée en ce qui concerne le rendement en aminoalcools au cours de la réduction des groupes C-terminaux de l'hormone ; pour des raisons pratiques, ce rendement n'a pas pu être déterminé. Les résultats de ces dosages ont été rassemblés dans le *tableau XIV*.

Après le dosage, les bandes recueillies sont évaporées à sec séparément et leur identification est faite par chromatographie sur papier Schleicher et Schülle 507, dans le système isoocane-isopropanol-eau, selon la technique décrite p. 27.

c) RÉSULTATS :

Tableau XIV

AMINOALCOOLS IDENTIFIÉS APRÈS LA RÉDUCTION DE L'HORMONE
ET DE SON ESTER PAR LiAlH_4

(Les chiffres sont exprimés en résidus de DNP-aminoalcools
par mole de l'hormone, de poids moléculaire 47.000 [98])

	Avant correction		Après correction	
Hormone native réduite à 35° C :				
DNP-colamine	0,80	0,86	0,87	0,94
DNP-phénylalaninol	traces			
Hormone estérifiée réduite à 35° C :				
DNP-colamine	1,40	1,30	1,50	1,40
DNP-phénylalaninol	0,82	0,79	0,86	0,82
Hormone estérifiée réduite à 60° C :				
DNP-colamine	1,62		1,76	
DNP-phénylalaninol	0,83		0,88	
DNP-X (alaninol ?)	0,55		—	

Les données du *tableau XIV* indiquent que :

- 1° La réduction de l'hormone native, à 35°, fait apparaître environ un radical de colamine et des traces de phénylalaninol.
- 2° La réduction de l'hormone estérifiée, à 35°, engendre 1,4 à 1,5 radicaux de colamine et environ 0,8 radical de phénylalaninol.
- 3° La réduction de l'hormone estérifiée, à 60°, fait apparaître 1,8 radicaux de colamine, environ 0,9 radical de phénylalaninol et moins de 0,5 radical d'un aminoalcool non identifié, mais dont le comportement au cours des différentes chromatographies correspond assez bien avec celui de l'alaninol.

La réduction à 35° provoque d'autre part l'apparition, à côté des aminoalcools cités ci-dessus, d'un artéfact dont le dérivé DNP, extrait dans les mêmes conditions que les DNP-aminoalcools et isolé par chromatographie sur Hyflo-supercel siliconé, donne un spectre d'absorption différent de ceux des aminoalcools (maximum à 380 $\text{m}\mu$). La réduction à 60° donne naissance à deux artéfacts.

REDUCTION AU MOYEN DE LiBH_4

Deux essais de réduction de l'hormone estérifiée par LiBH_4 ont été effectués, l'un à 65° dans les conditions décrites par CHIBNALL et REES [95], puis par GRASSMANN et coll. [66], et l'autre à température ordinaire selon la technique de LEGGETT BAILEY [97]. Dans les deux cas, la présence de plusieurs bandes de DNP-aminoalcools a été constatée par chromatographie sur Hyflo-supercel siliconé, de sorte qu'aucune conclusion n'a été possible. Ces observations sont en accord avec les résultats de CRAWHALL et ELLIOTT [68] obtenus récemment avec le lysozyme.

C. — DISCUSSION

Il apparaît que l'estérification dans des conditions apparemment douces et utilisées habituellement dans de nombreux cas de protéines, provoque la rupture de la chaîne peptidique de l'hormone avec la formation d'un groupement N-terminal du glycolle.

Pendant la réduction par LiAlH_4 à 35° , de l'hormone estérifiée ainsi partiellement dégradée, apparaît un deuxième résidu N-terminal du glycolle. Il en résulte qu'une autre coupure de la chaîne peptidique de l'hormone est effectuée dans les conditions de réduction.

Au cours de la réduction de l'hormone non estérifiée, à 35° , a lieu d'autre part une coupure également au niveau du résidu du glycolle engagé par son $-\text{NH}_2$.

Ces trois résultats semblent ainsi assez cohérents : une coupure apparaît dans chacune des opérations d'estérification et de réduction. La dégradation observée au cours de la réduction de l'hormone estérifiée est la résultante de ces deux dégradations successives.

La réduction par LiAlH_4 de l'hormone estérifiée, à 35° , fait apparaître d'autre part 1,4 à 1,5 résidus de DNP-colamine et 0,82 à 0,86 résidu de DNP-phénylalaninol.

Du fait que deux coupures successives de la chaîne peptidique de l'hormone ont été observées, on peut supposer que la colamine provient de la réduction des résidus C-terminaux engendrés par ces coupures : en d'autres termes, que deux liaisons glycyl-glycolle existant dans la chaîne peptidique de l'hormone ont été rompues. Ce point de vue est confirmé par le fait que la réduction de l'hormone non estérifiée donne naissance à 0,9 radical de colamine environ et à 1 radical environ de glycolle N-terminal, mais seulement à des

traces de phénylalaninol. Il est démontré ainsi que, si l'estérification de phénylalanine C-terminale paraît indispensable pour que sa réduction se fasse, le résidu de colamine peut apparaître sans qu'il soit nécessaire d'estérifier la protéine. Il est à peu près sûr que certaines liaisons glycyle sont particulièrement fragiles, non seulement aux agents d'hydrolyse [113], mais aussi aux agents de réduction, « when structural features are favourable » [68].

Quant au résidu de DNP-phénylalaninol obtenu après la réduction de l'hormone estérifiée à 35°, le résultat de Li et coll. avec la carboxypeptidase [22], nous autorise à admettre qu'il provient de la réduction de l'ester de la phénylalanine C-terminale. Les chiffres obtenus (0,82-0,86 résidu) semblent indiquer que l'hormone de croissance ne contient qu'un seul groupe C-terminal de phénylalanine par molécule de protéine¹. Il faudrait dans ce cas admettre, en tenant compte des résultats de Li et coll. [98, 99], qui attribuent à l'hormone de croissance 2 groupes N-terminaux, que cette protéine comporte un enchaînement linéaire branché, sous forme de Y. Cette conclusion est cependant trop importante pour que l'on puisse l'envisager avec certitude uniquement à la lumière des résultats de ce travail.

II. — Insuline

A. — GÉNÉRALITÉS

Nos premiers essais de réduction ont eu lieu en 1950 [57]. Nous avons alors utilisé LiAlH_4 , travaillant en milieu N-éthylmorpholine à 60°, pendant 8 heures, et sur une protéine non estérifiée. L'ensemble des résultats obtenus alors montre, tant du point de vue qualitatif que quantitatif, que dans la molécule élémentaire d'insuline, les aminoalcools éthéro-solubles engendrés sont au nombre de deux : on trouve environ 1 molécule d'alaninol et 1 molécule de colamine par molécule élémentaire.

La molécule d'insuline est actuellement bien connue et il n'y a aucune raison de critiquer sa formule telle qu'elle a été établie par SANGER et coll. [114, 115] :

(¹) L'augmentation de la température de réduction à 60° ne nous a permis d'augmenter que très faiblement (0,88 résidu) le rendement en phénylalaninol, alors que les réactions secondaires de coupure ont été plus nombreuses qu'à 35°.

Chaîne A :

Gly . Ileu . Val . Glu . Glu ($-\text{NH}_2$) . CySO_3H . CySO_3H
Ala . Ser . Val . CySO_3H . Ser . Leu . Tyr . Glu ($-\text{NH}_2$) .
Leu . Glu . Asp ($-\text{NH}_2$) . Tyr . CySO_3H . Asp ($-\text{NH}_2$)

Chaîne B :

Phe . Val . Asp (NH_2) . Glu ($-\text{NH}_2$) . His . Leu . CySO_3H .
Gly . Ser . His . Leu . Val . Glu . Ala . Leu . Tyr . Leu . Val .
 CySO_3H . Gly . Glu . Arg . Gly . Phe . Phe . Tyr . Thr
Pro . Lys . Ala

Elle se compose donc de deux chaînes, dites A et B, ayant respectivement le glycocolle et la phénylalanine en position N-terminale ; et si l'alaninol formé au cours de la réduction correspond effectivement à l'acide aminé C-terminal d'une de ces chaînes (chaîne B), il ne peut en être de même de la colamine. Pour expliquer la formation de ce dernier aminoalcool, il faut ainsi admettre qu'il y a eu coupure de la chaîne peptidique en un point où le glycocolle est engagé par son carboxyle. C'est dans le but d'élucider ce point que nous avons repris notre étude, procédant ici de la même manière que lors de nos précédents travaux sur l'hormone de croissance.

B. — PARTIE EXPÉRIMENTALE

REDUCTION AU MOYEN DE LiAlH_4

L'insuline utilisée dans ce travail est de l'insuline de bœuf cristallisée Boots, à 22,05 UI/mg. Les travaux analytiques récents de SANGER [114, 115] donnent pour la molécule élémentaire d'insuline, correspondant à la formule donnée plus haut, un poids moléculaire de 6.000 et la composition globale en acides aminés présentée dans le tableau XV.

On aura donc à réduire par molécule au maximum :

- 4 groupes carboxyliques de l'acide glutamique
- 3 groupes S-S de la cystine
- 2 groupes carboxyliques terminaux

9 groupes réductibles (dont 6 estérifiables)

En tenant compte du fait que les groupes $-\text{NH}_2$ libres sont susceptibles de se combiner avec LiAlH_4 (voir réaction III, p. 35) et que nous avons travaillé sur une molécule estérifiée, il faudra théoriquement 10 molécules de LiAlH_4 par mole d'insuline. En réalité, nous prendrons un excès important de réducteur.

Tableau XV
COMPOSITION DE L'INSULINE

Composition	Nombre de radicaux par mole d'insuline de bœuf	%
N ₂		16,04
Alanine	3	4,5
Arginine	1	2,9
Acide aspartique	3	6,9
Cystine	3	12
Acide glutamique	7	17,1
Glycocolle	4	5
Histidine	2	5,1
Isoleucine	1	2,1
Leucine	6	13,1
Lysine	1	2,4
Phénylalanine	3	8,2
Proline	1	1,9
Sérine	3	5,2
Thréonine	1	1,9
Tyrosine	4	12,1
Valine	5	9,7
— NH ₂	6	1,6

1. ESTERIFICATION

La méthode utilisée ici est exactement celle déjà citée (voir p. 51) de MOMMAERTS et NEURATH [107] : 500 mg d'insuline (séchée sous vide au pistolet à acétone pendant 8 heures) sont agités, en suspension dans 50 ml de méthanol — HCl 0,1 N, sec, à 25° pendant 24 heures. On précipite la protéine estérifiée par 2 volumes d'éther sec et on centrifuge. On lave le précipité 3 fois à l'éther et on le sèche. On obtient 688 mg d'ester méthylique de l'insuline titrant 12 % N₂.

Le rendement de l'estérification est de 99 %, selon le dosage des groupes méthoxy suivant la méthode de ZEISEL¹.

2. REDUCTION

Le processus utilisé est également toujours le même : 134 mg d'insuline estérifiée sèche sont traités, en suspension dans 10 ml de

(¹) Cette analyse a été effectuée par les soins du Laboratoire de Micro-analyse Ciba (Bâle, Suisse).

N-méthylmorpholine, par 239 mg (excès d'environ 40 fois) de LiAlH_4 , à 80 % d'hydrogène actif. L'opération dure 8 heures à 35° ; on refroidit alors le mélange à 0° et décompose l'excès d'hydrure au moyen de morpholine aqueuse. On précipite le produit réduit par adjonction de 2 volumes d'éther, on centrifuge, et on lave abondamment le précipité à l'éther jusqu'à disparition complète de l'odeur de morpholine. Ce produit est ensuite séché pendant la nuit au dessiccateur sous vide ; on obtient ainsi 570 mg de « produit réduit » sec formé d'insuline réduite mélangée avec $\text{Al}(\text{OH})_3$ et LiOH . La récupération de l'azote à ce stade est de 100 % par rapport à l'insuline estérifiée.

3. IDENTIFICATION ET DOSAGE DES DNP-AMINOACIDES

De même que lors de notre travail sur l'hormone de croissance (voir p. 52), nous avons utilisé la méthode DNP de SANGER [3] pour contrôler les ruptures éventuelles des chaînes peptidiques de l'insuline au cours d'un des traitements précédents. Ce contrôle a été fait sur l'insuline native, l'insuline estérifiée et l'insuline estérifiée réduite par LiAlH_4 .

a) FORMATION DU DNP :

Les quantités de substances correspondant à environ 1 mg d'insuline (d'après le dosage de N) sont traitées selon les indications de SANGER [3] : le produit, additionné de 20 mg de CO_3HNa , est dissout dans 0,4 ml d'eau ; on ajoute 30 mg (0,02 ml) de FDNB dans 0,8 ml d'éthanol et on agite pendant 2 heures ; la DNP-insuline précipite sous forme d'une poudre jaune. On centrifuge et lave successivement 3 fois par l'eau, 5 fois par l'éthanol et 3 fois par l'éther. On sèche durant la nuit au dessiccateur, sur CaCl_2 .

b) HYDROLYSE DU DNP :

La quantité totale de DNP obtenue est hydrolysée à reflux pendant 4 ou 8 heures selon le cas, par 3 ml de HCl 6 N. L'hydrolysât est refroidi et on extrait 3 fois à l'éther, l'extract éthéré total étant lavé en retour par l'eau. La fraction éthérée totale est alors évaporée sous vide à sec.

c) IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE :

Les DNP-aminoacides éthéro-solubles provenant des hydrolysats de la DNP-protéine obtenue aux différents stades indiqués, sont iden-

tifiés par chromatographie de partage sur colonne de 2 g de Hyflo-supercel tamponné à pH 7,25 avec pour solvant le mélange CHCl_3 - MEtCet - tampon, en des proportions variables. Le mode opératoire est en tous points identique à celui utilisé précédemment dans le cas de l'hormone de croissance (voir p. 53).

d) DOSAGE :

La pureté des DNP-aminoacides ainsi isolés est contrôlée et leur dosage est fait d'après leur spectre d'absorption entre 300 $\text{m}\mu$ et 400 $\text{m}\mu$, les solvants utilisés étant toujours les mêmes (voir p. 54). Les chiffres obtenus par ces dosages n'ont pas été corrigés, et les résultats en sont rassemblés dans le *tableau XVI*.

e) IDENTIFICATION DES DNP-AMINOACIDES :

L'identification des DNP-aminoacides se fait également par chromatographie sur papier, le seul solvant nécessaire ici étant le solvant général (voir p. 54).

f) RÉSULTATS :

Tableau XVI

RÉSIDUS N-TERMINAUX DÉTERMINÉS PAR LA MÉTHODE DE SANGER [3]
A DES STADES DIFFÉRENTS DU TRAITEMENT DE L'INSULINE

(Les chiffres sont exprimés en résidus de DNP-aminoacides
par mole d'insuline de poids moléculaire 6.000 [114, 115])

<i>Durée de l'hydrolyse du dérivé DNP (heures)</i>	<i>Différents stades</i>	<i>Résidus N-terminaux</i>	<i>Non corrigés</i>
8	Insuline native	DNP-glycocolle DNP-phénylalanine	0,50 0,84
8	Insuline estérifiée	DNP-glycocolle DNP-phénylalanine	0,50 - 0,52 0,72
4	Insuline estérifiée réduite	DNP-glycocolle DNP-phénylalanine DNP-sérine	0,38 0,73 0,13

En examinant le *tableau XVI*, nous pouvons constater que :

- 1° Les résultats de SANGER et coll. [114, 115] se retrouvent qualitativement en ce qui concerne les groupes N-terminaux de l'insuline et de l'insuline estérifiée.
- 2° Lors de la réduction de l'insuline estérifiée, par LiAlH_4 à 35° pendant 8 heures, il apparaît de la sérine N-terminale. Etant donné la très grande fragilité de la DNP-sérine observée d'une part par FRAENKEL-CONRAT et SINGER [116] et d'autre part par LEVY et LI [117], nous pouvons conclure, en nous basant principalement sur les résultats obtenus par LI et coll. [117, 118], qu'il y a apparition de 1 groupe N-terminal nouveau de sérine.

4. IDENTIFICATION ET DOSAGE DES DNP-AMINOALCOOLS

Les aminoalcools engendrés lors de la réduction de l'insuline estérifiée ont été isolés de l'hydrolysate du produit réduit sous forme de leurs dérivés DNP.

a) HYDROLYSE :

Une quantité de produit réduit correspondant à 80 mg environ d'insuline pure (selon dosage de N) a été hydrolysée par 20 ml HCl 6 N (en réalité on prend du HCl 9 N à cause de sa neutralisation partielle par les bases résultant de la décomposition de l'hydruure), à reflux pendant 24 heures. On élimine l'excès de HCl par évaporations successives alternées avec des additions d'eau. Finalement on porte l'hydrolysate à un volume connu : 10 ml.

b) FORMATION DES DNP-AMINOALCOOLS, ISOLEMENT, CARACTÉRISATION ET DOSAGE :

Une prise de 2 ml de l'hydrolysate est traitée par le FDNB selon la technique précédemment décrite (voir pp. 22-23). Après le passage sur colonne de 2 g d'alumine, le filtrat contenant notamment les DNP-aminoalcools formés est évaporé à sec sous vide et est repris par la phase aqueuse du système I : acétate de butyle (10) - acide acétique (20) - eau (100), de façon à l'amener à 2 ml.

Une prise de 0,5 ml, correspondant à l'équivalent de 4 mg d'insuline, est chromatographiée sur une colonne refroidie de 2 g de Hyflo-superpel siliciné, selon la technique déjà vue (voir pp. 24-27) en employant le même système I ; on mesure les R_F respectifs des bandes observées. La pureté des produits ainsi isolés est contrôlée comme précédemment et leur dosage est fait d'après leur spectre d'absorp-

tion entre 250 $m\mu$ et 450 $m\mu$, directement dans la phase aqueuse du système I utilisé pour cette chromatographie.

Les chiffres obtenus au cours de ces dosages n'ont pas été corrigés ; les résultats en sont rassemblés dans le *tableau XVII*.

Après le dosage, les solutions correspondant aux différentes bandes sont également identifiées par chromatographie sur papier selon la technique décrite p. 27.

c) RÉSULTATS :

Tableau XVII

AMINOALCOOL IDENTIFIÉ APRÈS LA RÉDUCTION DE L'INSULINE PAR $LiAlH_4$
(Les chiffres sont exprimés en résidu de DNP-aminoalcools
par mole d'insuline de poids moléculaire 6.000 [114, 115])

	<i>Non corrigés</i>	
Insuline estérifiée réduite : DNP-colamine	0,69	0,75

Les données du *tableau XVII* indiquent que par réduction de l'insuline estérifiée, à 35°, pendant 8 heures, on observe uniquement la formation de colamine.

C. — DISCUSSION

En comparant ces derniers résultats à ceux obtenus lors de nos premiers essais [57] et étant donné que la structure de l'insuline est maintenant tout à fait bien connue, nous pouvons conclure que : 1° pendant la réduction de l'insuline estérifiée, à 35°, il se produit uniquement une coupure de la chaîne peptidique avec formation d'environ 1 groupement N-terminal de sérine ; d'autre part cette même réduction fait apparaître 0,69 à 0,75 (n.c.) résidu de DNP-colamine. On peut ainsi supposer que la colamine provient de la réduction du résidu C-terminal engendré par la coupure, autrement dit que la liaison glycyl-sérine existant dans la chaîne B de l'insuline a été rompue. 2° Lors de la réduction à 60° de l'insuline native [57], cette même coupure doit avoir lieu ; ainsi nous pouvons expliquer l'origine de la molécule de colamine observée, tandis que seule la molécule d'alanyl formé correspond à un acide aminé C-terminal de la chaîne d'in-

suline. Cette nouvelle interprétation est en complet accord avec la structure de la molécule élémentaire, telle qu'elle a été établie par SANGER et ses collaborateurs [114, 115].

III. — Cas de la pepsine

Notons enfin que WILLIAMSON et PASSMANN [69] ont déterminé le groupement carboxylique terminal de la pepsine (poids moléculaire 35.000). Ils ont appliqué d'une part notre technique de réduction à la protéine non estérifiée, travaillant dans l'éther pendant 8 heures à 35°, et d'autre part la méthode enzymatique par emploi de la carboxypeptidase. Dans les deux cas, ils trouvent 2 molécules d'alanine C-terminale par mole de pepsine, ce qui leur permet de conclure que cette protéine présente une chaîne ramifiée, étant donné que ces mêmes auteurs [119] n'ont trouvé qu'un résidu de leucine N-terminale par molécule de pepsine.

* *

En définitive, dans le cas de certaines protéines comme cela semble être le cas pour la pepsine et le lysozyme, les résultats obtenus par réduction avec LiAlH_4 sont nets et précis. Par contre, dans le cas des protéines présentant dans leur enchaînement peptidique des résidus glycolle engagés par leur carboxyle dans une liaison particulièrement fragile, des coupures sont à craindre en ce point : c'est ce que nous observons avec l'hormone de croissance ainsi qu'avec l'insuline. Néanmoins, comme nous l'avons vu, il est possible de déceler avec certitude ce phénomène de coupure.

Ce phénomène de coupure, s'il est gênant quand on se propose de déterminer les résidus C-terminaux d'une protéine, pourrait peut-être servir de base de départ pour la mise au point d'une méthode de dégradation partielle d'une chaîne peptidique. Les fragments ainsi obtenus pourraient être utilisés pour l'étude de la structure d'une protéine.

Quoi qu'il en soit, la réduction des protéines au moyen de LiAlH_4 peut rendre service si on l'applique avec toutes les précautions requises, en particulier là où les résultats obtenus par d'autres méthodes sont à contrôler.

RESUME

Nous avons mis au point une méthode chimique consistant essentiellement à réduire, au moyen d'hydrures métalliques doubles, les groupes carboxyliques libres des peptides et protéines en alcools primaires correspondants. Puis, après hydrolyse totale du peptide ou de la protéine ainsi réduits, les aminoalcools éventuellement formés sont isolés sous forme de leurs dérivés dinitrophénylés (DNP), caractérisés par chromatographies sur colonne et sur papier et dosés colorimétriquement au spectrophotomètre de Beckman.

Tout au long de notre travail, nous nous sommes efforcés d'élucider le comportement des liaisons peptidiques lors de la réduction d'une chaîne peptidique. Dans ce but nous avons, en premier lieu, fait une étude systématique de la réduction des peptides afin de déterminer les meilleures conditions requises pour obtenir la réduction de leurs carboxyles terminaux avec un bon rendement, tout en limitant au maximum l'attaque par l'hydrure double de la liaison peptidique, de même que sa rupture. Nous avons étudié l'emploi de deux hydrures doubles : celui de lithium et d'aluminium ainsi que celui de lithium et de bore ; seul le premier s'est avéré devoir retenir notre attention.

Puis, dans le cas des protéines, nous avons étudié ce phénomène de rupture, nous efforçant de déceler toute coupure de la chaîne pouvant survenir soit lors de l'estérification, soit lors de la réduction. Toute coupure de la chaîne protéique devant se manifester par l'apparition d'un acide aminé N-terminal supplémentaire, nous avons pu mettre celui-ci en évidence dans le « produit réduit » non hydrolysé, en traitant ce dernier avec le fluorodinitrobenzène (FDNB), selon la technique de SANGER et en isolant après hydrolyse les DNP-aminoacides ainsi formés.

1) CAS DES PEPTIDES

Nous avons constaté que, dans le cas de dérivés benzoylés d'acides aminés ou de peptides, il faut opérer à basse température (0°) et sur

des molécules estérifiées. Dans ces conditions la réduction du carboxyle terminal en alcool correspondant, par LiAlH_4 , se fait avec un assez bon rendement, les deux types de réactions secondaires étant alors négligeables.

2) APPLICATION AUX PROTEINES

a) CAS DE L'HORMONE DE CROISSANCE :

Les résultats obtenus par réduction de l'ester de l'hormone de croissance, à 35° et au moyen de LiAlH_4 , montrent que cette protéine contient un groupe C-terminal de phénylalanine par molécule. Il a d'autre part été observé que dans chacune des opérations d'estérification et de réduction, apparaissait une coupure de liaison glycylglycocolle existant dans la chaîne peptidique.

b) CAS DE L'INSULINE :

Par réduction de l'insuline estérifiée, à 35° et au moyen de LiAlH_4 , nous avons pu mettre en évidence l'apparition d'une coupure dans la chaîne peptidique, mais uniquement lors de l'opération de réduction. Cette coupure correspond à la rupture de la liaison glycyl-sérine existant dans la chaîne B de la molécule élémentaire d'insuline, en accord avec sa structure telle qu'elle a été établie par SANGER et ses collaborateurs.

* *

Ainsi, dans le cas de la réduction de protéines présentant dans leur enchaînement peptidique des résidus glycocolle engagés par leur carboxyle dans une liaison particulièrement fragile, il se produit une rupture en ce point, avec formation de colamine dans le milieu réduit.

Ce phénomène de coupure, s'il est gênant quand on se propose de déterminer les résidus C-terminaux d'une protéine, pourrait peut-être servir de point de départ pour la mise au point d'une méthode de dégradation partielle d'une chaîne peptidique. Les fragments ainsi obtenus pourraient être utilisés pour l'étude de la structure d'une protéine.

Quoi qu'il en soit, la réduction des protéines au moyen de LiAlH_4 , peut rendre service si on l'applique avec toutes les précautions requises, en particulier là où les résultats obtenus par d'autres méthodes sont à contrôler. Elle peut très certainement s'appliquer aux peptides courts.

BIBLIOGRAPHIE

1. H.S. OLCOTT et H. FRAENKEL-CONRAT — *Chem. Revs.* 41 (1947) 151.
2. R.R. PORTER — *The Proteins*. Vol. I, Part. B (1953) 973.
3. F. SANGER — *Biochem. J.* (London) 39 (1945) 507.
4. P. EDMAN — *Acta Chim. Scand.* 4 (1950) 277, 283.
5. H. FRAENKEL-CONRAT — *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 3606.
6. H. FRAENKEL-CONRAT et J.I. HARRIS — *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 6058.
7. S.W. FOX, T.L. HURST et K.F. ITSCHNER — *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 3573.
8. S.W. FOX, T.L. HURST et C. WARNER — *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 1154.
9. S.W. FOX et D. DE FONTAINE — *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 3701.
10. R.F. NYSTROM et W.G. BROWN — *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 1197.
11. R.F. NYSTROM et W.G. BROWN — *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 2548.
12. R.F. NYSTROM et W.G. BROWN — *J. Am. Chem. Soc.* 70 (1948) 3738.
13. S.W. FOX — *Adv. in Prot. Chem.* 2 (1945) 156.
14. L. PENASSE — *Th. Sc. Doct. Univ. Paris* (1952).
15. M. JUTISZ — *Bull. soc. chim. biol.* 36 (1954) 109.
16. E.L. SMITH — *Adv. in Enzymol.* 12 (1951) 225.
17. E. WALDSCHIMDT-LEITZ et K. GAUSS — *Ber. deut. chem. Ges.* 85 (1952) 352.
18. J. LENS — *Biochim. et Biophys. Acta* 3 (1949) 367.
19. D. STEINBERG — *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 4217.
20. D. STEINBERG — *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 4875.
21. E. DAVIE et H. NEURATH — *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 6305.
22. J.I. HARRIS, C.H. LI, P.G. CONDLIFFE et N.G. PON — *J. Biol. Chem.* 209 (1954) 133.
23. P. DESNUELLES — *Adv. in Enzymol.* 14 (1954) 261.
24. J.A. GLADNER et H. NEURATH — *Biochim. et Biophys. Acta* 9 (1952) 335.
25. E. ABDERHALDEN et H. BROCKMANN — *Biochem. Z.* 225 (1930) 386.
26. M. BERGMAN et L. ZERVAS — *J. Biol. Chem.* 113 (1936) 341.
27. F. BETTZIECHE — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 161 (1926) 37, 178.
28. E.C. KENDALL, H.L. MASON et B.F. MCKENZIE — *J. Biol. Chem.* 87 (1930) 55.

29. N. LICHTENSTEIN, S. HESTRIN, E. DIMANT et H. BRZOZA — *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938) 560.
30. F. ZETZSCHE, E. LÜSCHER et H.E. MEYER — *Ber. deut. chem. Ges.* 71 (1938) 1088.
31. H.G. KHORANA — *J. Chem. Soc.* (1952) 2081.
32. T. WIELAND et H. FRITZ — *Ber. deut. chem. Ges.* 83 (1953) 1186.
33. P. SCHLACK et W. KUMPF — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 154 (1926) 125.
34. B.H. NICOLET — *J. Biol. Chem.* 88 (1930) 389.
35. J. TIBBS — *Nature* 168 (1951) 910.
36. S.G. WALEY et J. WATSON — *J. Chem. Soc.* (1951) 2394.
37. V.H. BAPTIST et H.B. BULL — *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 1727.
38. R.A. TURNER et G. SCHMERZLER — *Biochim. et Biophys. Acta* 13 (1954) 553.
39. G.W. KENNER, H.G. KHORANA et R.J. STEDMAN — *J. Chem. Soc.* (1953) 673.
40. S.W. FOX, T.L. HURST, J.F. GRIFFITH et O. UNDERWOOD — *J. Am. Chem. Soc.* 77 (1955) 3119.
41. S. AKABORI, K. OHNO et K. NARITA — *Bull. Chem. Soc. Japan* 25 (1952) 214.
42. K. OHNO — *J. Biochem. (Japan)* 40 (1953) 621.
43. K. OHNO — *J. Biochem. (Japan)* 41 (1954) 345.
44. K. OHNO — *J. Biochem. (Japan)* 42 (1955) 615.
45. R.H. LOCKER — *Biochim. et Biophys. Acta* 14 (1954) 533.
46. C.I. NIU et H. FRAENKEL-CONRAT — *J. Am. Chem. Soc.* 77 (1955) 5882.
47. R.A. BOISSONNAS — *Helv. Chim. Acta* 35 (1952) 2226.
48. A.E. FINHOLT, A.C. BOND et H.I. SCHLESINGER — *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 1199.
49. L.W. TREVOY et W.G. BROWN — *J. Am. Chem. Soc.* 71 (1949) 1675.
50. J.E. JOHNSON, R.H. BLIZZARD et H.W. CARHART — *J. Am. Chem. Soc.* 70 (1948) 3664.
51. U. SOLMS — *Chimia* 5 (1951) 25.
52. W.G. BROWN — *Org. Reactions* VI (1951) 469.
53. P. JOLLÈS et C. FROMAGEOT — *Bull. soc. chim. France* 18 (1951) 862.
54. P. JOLLÈS et C. FROMAGEOT — *Biochim. et Biophys. Acta* 9 (1952) 287.
55. P. JOLLÈS et C. FROMAGEOT — *Biochim. et Biophys. Acta* 9 (1952) 416.
56. P. KARRER, P. PORTMANN et M. SUTER — *Helv. Chim. Acta* 31 (1948) 1617.
57. C. FROMAGEOT, M. JUTISZ, D. MEYER et L. PENASSE — *Biochim. et Biophys. Acta* 6 (1950) 283.
58. P. KARRER, M. SUTER et P. WASER — *Helv. Chim. Acta* 32 (1949) 1936.
59. P. KARRER et P. PORTMANN — *Helv. Chim. Acta* 32 (1949) 1034.
60. A. RHEIN et M. JUTISZ — *Biochim. et Biophys. Acta* 9 (1952) 645.
61. R. ACHER, M. JUTISZ et C. FROMAGEOT — *Biochim. et Biophys. Acta* 8 (1952) 442.

62. P. BOULANGER et G. BISERTE — *Bull. soc. chim. biol.* 33 (1951) 1930.
63. C. FROMAGEOT, M. JUTISZ et E. LEDERER — *Biochim. et Biophys. Acta* 2 (1948) 487.
64. L. PENASSE, M. JUTISZ, C. FROMAGEOT et H. FRAENKEL-CONRAT — *Biochim. et Biophys. Acta* 9 (1952) 551.
65. M. JUTISZ, M. PRIVAT DE GARILHE, M. SUQUET et C. FROMAGEOT — *Bull. soc. chim. biol.* 36 (1954) 117.
66. W. GRASSMANN, H. HÖRMANN et H. ENDRES — *Chem. Ber.* 86 (1953) 1477.
67. W. GRASSMANN, H. HÖRMANN et H. ENDRES — *Chem. Ber.* 88 (1955) 102.
68. J.C. CRAWHALL et D.F. ELLIOTT — *Biochem. J.* (London) 61 (1955) 264.
69. M.B. WILLIAMSON et J.M. PASSMANN — *Biochim. et Biophys. Acta* 15 (1954) 246.
70. T. WIELAND — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 273 (1942) 24.
71. E. CHARGAFF, C. LEVINE et C.H. GREEN — *J. Biol. Chem.* 175 (1948) 67.
72. R. ACHER, C. FROMAGEOT et M. JUTISZ — *Biochim. et Biophys. Acta* 5 (1950) 81.
73. H. JATZKEWITZ et N.-D. TAM — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 296 (1954) 188.
74. P. FLEURY et J. LANGE — *Compt. rend.* 195 (1932) 1395.
75. P. FLEURY et R. PARIS — *Compt. rend.* 196 (1933) 1416.
76. P. FLEURY et S. BOISSON — *Compt. rend.* 204 (1937) 1264.
77. P. FLEURY et J. COURTOIS — *Compt. rend.* 209 (1939) 219.
78. P. FLEURY, J. COURTOIS et M. GRANDCHAMP — *Bull. soc. chim. France* (1949) 88.
79. P. FLEURY, J. COURTOIS et M. GRANDCHAMP — *Biochim. et Biophys. Acta* 3 (1949) 336.
80. L.A. SHINN et B.H. NICOLET — *J. Am. Chem. Soc.* 61 (1939) 1615.
81. L.A. SHINN et B.H. NICOLET — *J. Biol. Chem.* 138 (1941) 91.
82. L.A. SHINN et B.H. NICOLET — *J. Biol. Chem.* 139 (1941) 687.
83. L.A. SHINN et B.H. NICOLET — *J. Biol. Chem.* 142 (1942) 139.
84. E.J. CONWAY et E. O'MALLEY — *Biochem. J.* (London) 36 (1942) 655.
85. Handbook of Chemistry and Physics — 30^e Ed. Chemical Rubber Publishing Co. Cleveland, 1947, p. 1345.
86. F.F. BLICKE et CHI-JUNG-LU — *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 3933.
87. P. KARRER et B.J. NICOLAUS — *Helv. Chim. Acta* 35 (1952) 1581.
88. O. WITTIG et P. HORNBERGER — *Liebigs Ann.* 577 (1952) 11.
89. H.R. SNYDER et R.E. PUTNAM — *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 1893.
90. E. FISCHER — *Chem. Ber.* 37 (1904) 2486.
91. C. SCHOTTEN — *Ber. deut. chem. Ges.* 21 (1888) 2235.
92. E. BAUMANN — *Ber. deut. chem. Ges.* 19 (1886) 3218.
93. M.S. DUNN et W. DRELL — Experiments in Biochemistry, 1^{re} Ed. Mc Graw Hill Book Company Inc., London, 1951, p. 29.

94. E. FISCHER et A. SPEIER — *Ber. deut. chem. Ges.* 28 (1895) 3252.
 95. A. CHIBNALL et M.W. REES — In *The Chemical Structure of Proteins*, ed. by G.E.W. Wolstenholme and M.P. Cameron. London: J.A. Churchill Ltd., 1953, p. 70.
 96. H. HÖRMANN, W. GRASSMANN, E. WÜNSCH et H. PRELLER — *Chem. Ber.* 89 (1956) 933.
 97. J. LEGGETT BAILEY — *Biochem. J.* (London) 60 (1955) 170.
 98. C.H. LI et L. ASH — *J. Biol. Chem.* 203 (1953) 419.
 99. A.L. LEVY et C.H. LI — *J. Biol. Chem.* 217 (1955) 355.
 100. C.H. LI, M. EVANS et M.E. SIMPSON — *J. Biol. Chem.* 159 (1945) 353.
 101. C.H. LI et K.O. PEDERSON — *J. Biol. Chem.* 201 (1953) 595.
 102. C.H. LI — *J. Biol. Chem.* 211 (1954) 555.
 103. P. FONSS-BECH et C.H. LI — *J. Biol. Chem.* 207 (1954) 175.
 104. H. CLAUSER et C.H. LI — *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 4337.
 105. K. FELIX et H. REINDEL — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 205 (1932) 11.
 106. H. FRAENKEL-CONRAT et H.S. OLCOTT — *J. Biol. Chem.* 161 (1945) 259.
 107. W.F. MOMMAERTS et H. NEURATH — *J. Biol. Chem.* 185 (1950) 909.
 108. H.A. SAROFF, N.R. ROSENTHAL, E.R. ADAMIK, N. HAGES et H.A. SHERAGA — *J. Biol. Chem.* 205 (1953) 255.
 109. J.C. PERONE — *Nature* 167 (1951) 513.
 110. G.L. MILLS — *Biochem. J.* (London) 50 (1952) 707.
 111. G. BISERTE et R. OSTEUX — *Bull. soc. chim. biol.* 35 (1951) 50.
 112. R. MONIER et L. PENASSE — *Compt. rend.* 230 (1950) 1176.
 113. R.L.M. SYNGE — *Biochem. J.* (London) 39 (1945) 351.
 114. F. SANGER et H. TUPPY — *Biochem. J.* (London) 49 (1951) 463, 481.
 115. F. SANGER et E.O.P. THOMPSON — *Biochem. J.* (London) 53 (1953) 353, 366.
 116. H. FRAENKEL-CONRAT et B. SINGER — *Arch. Biochem. and Biophys.* 60 (1956) 64.
 117. A.L. LEVY et C.H. LI — *J. Biol. Chem.* 213 (1955) 487.
 118. J.I. HARRIS et C.H. LI — *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 3607.
 119. M.B. WILLIAMSON et J.M. PASSMANN — *J. Biol. Chem.* 199 (1952) 121.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
------------------------	---

Première partie

HISTORIQUE DES AUTRES METHODES

I. MÉTHODES ENZYMATIQUES	7
II. MÉTHODES CHIMIQUES	8
1. Condensation du carboxyle avec un réactif spécifique	8
2. Scission spécifique du groupe C-terminal non transformé	13
3. Méthode utilisant l'oxydation du carboxyle	14

Deuxième partie

METHODE DE REDUCTION ET TECHNIQUES UTILISEES

I. RÉDUCTION	15
II. HYDROLYSE	20
III. AMINOALCOOLS	20
1. Préparation	21
2. Déminéralisation	21
3. Isolement	22
4. Caractérisation	23
5. Détermination quantitative	28

Troisième partie

CAS DES PEPTIDES

I. RÉDUCTION AU MOYEN DE LiAlH_4	33
A. Partie expérimentale	34
B. Résultats et discussion	40
II. RÉDUCTION AU MOYEN DE LiBH_4	43
A. Aperçu historique	43
B. Partie expérimentale	44
C. Résultats et discussion	46

Quatrième partie
CAS DES PROTEINES

I. HORMONE DE CROISSANCE	49
A. Généralités	49
B. Partie expérimentale :	
Réduction au moyen de LiAlH_4	50
1. <i>Estérification</i>	51
2. <i>Réduction</i>	52
3. <i>Identification et dosage des DNP-aminoacides</i>	52
4. <i>Identification et dosage des DNP-aminoalcools</i>	55
Réduction au moyen de LiBH_4	58
C. Discussion	58
II. INSULINE	59
A. Généralités	59
B. Partie expérimentale :	
Réduction au moyen de LiAlH_4	60
1. <i>Estérification</i>	61
2. <i>Réduction</i>	61
3. <i>Identification et dosage des DNP-aminoacides</i>	62
4. <i>Identification et dosage des DNP-aminoalcools</i>	64
C. Discussion	65
III. CAS DE LA PEPSINE	66
RESUME	67
BIBLIOGRAPHIE	69

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

RECHERCHES RECENTES SUR L'ACIDE SIALIQUE
(Ou acide neuraminique)

Vu et approuvé :

Paris, le 17 Janvier 1957

Le Doyen de la Faculté des Sciences :

J. PERES

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris :

JEAN SARRAILH

